

宮崎大学大学院
博士学位論文

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

2014年3月

宮崎大学大学院農学工学総合研究科
資源環境科学 専攻

津田 浩利

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

Breeding studies on blueberries using native species of genus *Vaccinium*
in Japan

津 田 浩 利

2014

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

津 田 浩 利

Certification

We, the undersigned, herewith certify that this dissertation, entitled 'Breeding studies on blueberries using native species of genus *Vaccinium* in Japan' was not previously presented for the award of degree. and those experiments contained herein were independently conducted by Hirotooshi Tsuda under our supervision, and hereby submitted to the Interdisciplinary Graduate School of Agriculture and Engineering, University of Miyazaki, Japan in partial fulfillment of the requirements for the award of Doctor of Philosophy (Ph. D.) degree is accepted for presentation.

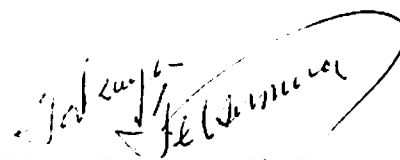
Approved by:



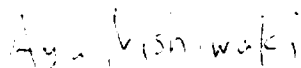
Hisato Kunitake, Ph. D.
University of Miyazaki



Tsutomu Yabuya, Ph. D.
University of Miyazaki



Takuya Tetsumura, Ph. D.
University of Miyazaki



Aya Nishiwaki, Ph. D.
University of Miyazaki



Koichiro Shiomori, Ph. D.
University of Miyazaki

The Interdisciplinary Graduate School of Agriculture and Engineering,
University of Miyazaki
Japan

January, 2014

目 次

序章	1
第 1 章 シャシチャンボおよびナツハゼ果実の機能性評価	
1. 緒言	9
2. 材料および方法	11
3. 結果	16
4. 考察	26
5. 摘要	30
第 2 章 スノキ属植物における効率的な染色体倍加方法の検討	
1. 緒言	31
2. 材料および方法	33
3. 結果	37
4. 考察	45
5. 摘要	50
第 3 章 スノキ属植物における種間交雑	
1. 緒言	51
2. 材料および方法	53
3. 結果	60
4. 考察	89
5. 摘要	98

第 4 章 スノキ属における高 pH 土壌適応システムの効率的な選抜法の開発

1. 緒言 99
2. 材料および方法 100
3. 結果および考察 103
4. 摘要 112

第 5 章 総合考察 114

要約 122

英文要約 127

謝辞 133

引用文献 134

本研究で用いる略語一覧

- CAPS: Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
- cpDNA: Chloroplast DNA
- CTAB: Cetyltrimethylammonium Bromide
- DMACA: Dimethylammonium Nonachlorodiantimonate
- DMSO: Dimethyl Sulfoxide
- DPPH: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
- DW: Dry Weight
- EDTA: Ethylenediaminetetraacetic Acid
- FAA: Formalin-acetic Acid-alcohol
- FCM: Flow Cytometry, Flow Cytometer
- FDA: Fluorescein Diacetate
- FW: Flesh Weight
- HPLC: High Performance Liquid Chromatography
- HL-60: HL-60 Cell Line
(Human Promyelocytic Leukemia Cells)
- MS: Murashige and Skoog medium
- mtDNA: Mitochondrial DNA
- MW: Mixture of equal parts of MS and WPM
- PBS: Phosphate-buffered saline
- PCR: Polymerase Chain Reaction
- PI: Propidium Iodide
- PVP: Polyvinylpyrrolidone
- RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA
- SSR: Simple Sequence Repeat
- WPM: Woody Plant Medium

序章

ブルーベリー (Blueberries) は、ツツジ科 (Ericaceae) スノキ属 (*Vaccinium*), *Cyanococcus* 節に分類される北アメリカ原産の落葉性および常緑性の低木性果樹である。ブルーベリーのうち、栽培および産業上重要な種は、ハイブッシュブルーベリー (*V. corymbosum*), ラビットアイブルーベリー (*V. virgatum*) およびローブッシュブルーベリー (*V. angustifolium*) の 3 種である (Retamales・Hancock, 2012)。これらのうち、ハイブッシュブルーベリーは、低温要求量の多少、耐寒性および樹高により北部 [Northern (High-chill) highbush blueberry], 南部 [Southern (Low-chill) highbush blueberry] および半樹高 (Half-high highbush blueberry) の 3 群に分けられる (Retamales・Hancock, 2012)。

ブルーベリー育種の歴史は他の果樹と比較して浅く、品種改良は 20 世紀に入り急速に発展した (Hancock, 2006a, 2006b)。ハイブッシュブルーベリーの育種は 1900 年代初頭にアメリカのニュージャージー州で始まり、1908 年にアメリカ農務省の Coville 博士により最初の雑種が育成された (Retamales・Hancock, 2012)。ブルーベリーにおける第 1 遺伝子プールは、ハイブッシュブルーベリー ($2n = 4x = 48$), ローブッシュブルーベリー ($2n = 4x = 48$) およびラビットアイブルーベリー ($2n = 6x = 72$) の 3 種により構成され、栽培化されていない *Cyanococcus* 節の種が第 2 遺伝子プールを構成する (Lyrene・Ballington, 1986)。過去 100 年間のブルーベリー育種におい

て、第 1 遺伝子プールの有用形質の組み合わせや野生種の生殖質からの新規形質導入を目的として、同倍数体間または異倍数体間における広範囲な種間交雑が行われてきた (Brevisら, 2008)。1948 年にフロリダ大学で始まった第 2 遺伝子プールを利用した遠縁交雑は、南部ハイブッシュブルーベリーの育成に帰結した (Sharpe, 1953)。南部ハイブッシュブルーベリーは、ハイブッシュブルーベリー、ローブッシュブルーベリー、ラビットアイブルーベリーおよびアメリカ南東部に自生する二倍体種との交雑により育成された低温要求量の少ない種間雑種である (Ballington, 1990; Draper, 1997; Lyrene・Ballington, 1986; Sharpe・Darrow, 1959)。ブルーベリー育種における種間交雑の利用は、野生種から栽培種への有用形質導入およびハイブッシュブルーベリーの栽培可能地域拡大を実現した (Brevisら, 2008)。しかしながら、近年、分子遺伝学的解析により、南部ハイブッシュブルーベリーの遺伝子多様性はこれまで考えられていたよりも小さく、北部ハイブッシュブルーベリーと同程度であることが明らかとなった (Brevisら, 2008)。現在栽培されているハイブッシュブルーベリーの 75%以上は Coville 博士が育種したものである (Mainland, 1998)。したがって、Coville 博士による研究以降、長期間の選抜育種が継続されたことでハイブッシュブルーベリー品種のヘテロ接合性が減少を続け、遺伝子多様性が低下したと考えられる (Brevisら, 2008)。一方で、Bochesら (2006) は Simple Sequence Repeat (SSR) マーカーによる解析の結果、ハイブッシュブルーベリーの野生種群が栽培品

種と比較して高い遺伝的多様性を有することを明らかにしている。そのため、今後、ブルーベリー品種の遺伝的多様性を高めていくためには、第1および第2遺伝子プールにおける未利用遺伝資源の利用と *Cyanococcus* 節以外の節に分類される第3遺伝子プール (Lyrene・Ballington, 1986) の種の活用が重要であると考えられる。

世界におけるスノキ属植物の果実生産は増加傾向にあり、2011年の生産量は約357,000 t、栽培面積は約81,000 haに達している (FAOSTAT, <http://faostat.fao.org/>, 2011)。現在、主要生産地域である北米のブルーベリー栽培面積は40,000 haに達しており、過去5年間で栽培面積は約50%増加した (Brazelton, 2009)。また、ハイブッシュブルーベリーとラビットアイブルーベリーは国際的な主要果樹に成長し、南米 (16,200 ha)、欧州 (2,000 ha)、日本・中国 (2,000 ha) およびオーストラリア・ニュージーランド (1,200 ha) で栽培面積が増大している (Hancock, 2012)。さらに、世界で生産されるハイブッシュブルーベリー果実の約3分の2は生食用として消費されており、過去12年間にブルーベリーの消費は2倍に拡大した (Retamales・Hancock, 2012)。この消費拡大の一因は、1990年代にブルーベリーが高い抗酸化能を示す果実の一つであることが明らかになったことにある (Priorら, 1998)。ブルーベリーの果実には、アントシアニン、ケルセチン、ケンフェロール、ミルセチン、クロロゲン酸、プロアントシアニンジンなどのフェノール化合物が含まれ、これらが抗酸化能に寄与している (Retamales・Hancock, 2012)。抗酸化物質は、

がん，心臓病および他の加齢に伴う病気の発生に關与する不安定な分子であるフリーラジカルを中和する作用を持つ（Wangら，2012a）．我々の日常の食事により吸収される抗酸化化合物は，酸化傷害の結果引き起こされる疾病の予防に寄与していると考えられる（Wangら，2012a）．また，ブルーベリーには，抗酸化能以外にも，視力改善機能（Canter・Ernst，2004），抗炎症能（Chenら，2008），がん予防効果（Cookeら，2006；Dingら，2006），神経保護機能（Fuentelbaら，2011；Rendeiroら，2012），骨粗しょう症予防効果（Zhangら，2011）およびメタボリックシンドローム予防効果（Priorら，2008）等の機能が報告されている（入間ら，2013）．このような背景の元，ブルーベリーにおける果実品質の評価項目は，大きさ，糖含量，酸含量および硬度のみでなく抗酸化物質濃度を含むまでに変化してきている（Retamales・Hancock，2012）．近年，ブルーベリーの育種は果実品質の中でも特に栄養価値に焦点が当てられており，生理活性物質を豊富に含む品種の育成が試みられている（Scalzoら，2005；Wangら，2012b）．前述したように，果実における高い抗酸化能にはアントシアニン等のフェノール化合物や他のフラボノイド化合物が寄与している（Wangら，2012a，2012b）．そのため，人の健康に寄与する高い栄養機能性を有するブルーベリー品種育成のためには，育種素材における果実の成分・特性等を把握することが不可欠であると考えられる．

日本では，1951年に農林水産省北海道農業試験場が，アメリカのマサチューセッツ州立農業試験場からハイブッシュブ

ブルーベリーを導入した（岩垣・石川，1984）．国内におけるブルーベリー栽培は1980年代から急速に普及し，現在に至るまで栽培面積および果実収穫量ともに増加傾向が続き，2009年の栽培面積は1,041 ha，果実収穫量2,259 tに達している（農林水産省生産局果樹花き課，<http://www.maff.go.jp/>，2011）（Fig. 1）．現在の主産地は，長野県（467 t），群馬県（284 t），東京都（184 t）であるが，九州地方でも近年，収穫量が徐々に増加しており，福岡県，熊本県，鹿児島県，宮崎県，大分県，佐賀県および長崎県において，それぞれ42.0 t，37.7 t，22.1 t，15.4 t，11.0 t，3.1 tおよび1.8 tとなっている（農林水産省生産局果樹花き課，<http://www.maff.go.jp/>，2011）．また，日本で栽培されているブルーベリーの多くは主に米国で育成されたものであり，国内で育成された品種は17品種のみである（農林水産省，<http://www.hinsyu.maff.go.jp/>，2013）（Table 1）．一方で，ブルーベリーと近縁のスノキ属植物は，北海道から沖縄県に至る広範囲に19種自生している（山崎，1989）．このうち野生のクロマメノキ（*V. uliginosum*）とコケモモ（*V. vitis-idaea*）の果実は，生食用，ジャムや菓子などの加工原料用として利用されてきた（Iwagakiら，1977；大黒ら，1989）．また，シャシャンボ（*V. bracteatum*）とナツハゼ（*V. oldhamii*）の生果実は地元の人々により食されており（Iwagakiら，1977），後者は生け花の花材としても人気があり市場流通している（諏訪・矢吹，2002）．以上のように，日本産スノキ属植物の利用は限定的であり，古くから育種素材としての有望性は指摘されてきたが（Iwagakiら，1977；串間，1986；大黒ら，1989），

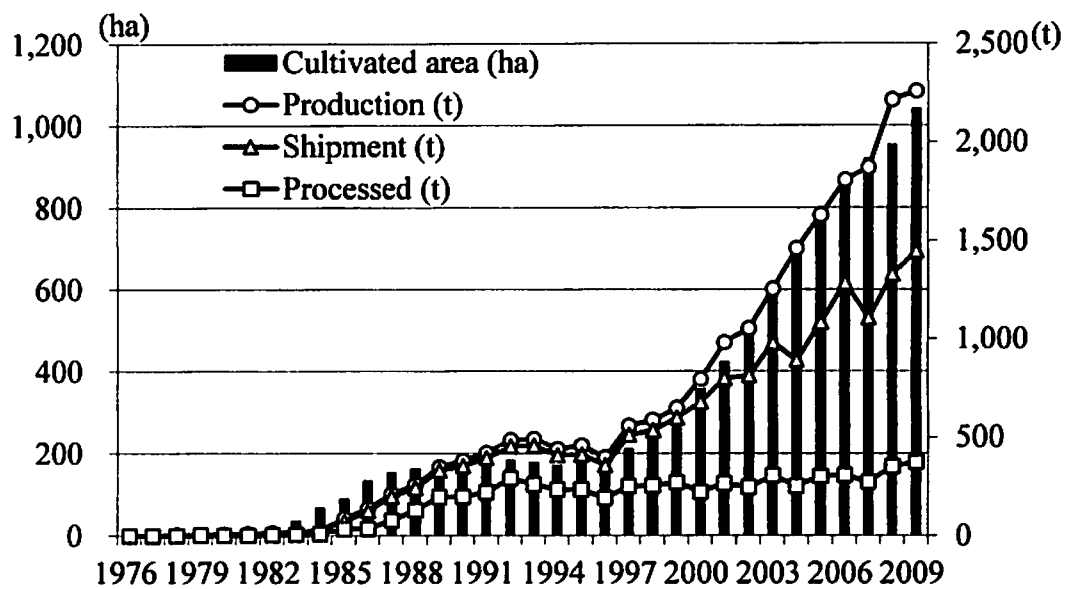


Fig.1 Cultivated area, production, shipment and processed amount of blueberry in Japan, 1976-2009 (Ministry of Agriculture and Fisheries, 2013).

Table 1 Blueberry cultivars developed in Japan (Ministry of Agriculture and Fisheries, 2013).

Cultivars	Date of registration	Applicant / Inventor
Otsububoshi	29 Oct. 1998	Gunma prefecture
Amatsububoshi	15 Apr. 1999	Gunma prefecture
Hayabayaboshi	3 Mar. 2004	Gunma prefecture
Redpearl	13 Sept. 2005	Tokai University, Hisato Kunitake, Tetsuro Kage, Katsunori Yoshioka
Fukuberry	18 Mar. 2008	Toshi Fukuda
Jinbao	3 Jun. 2008	Komachien LCC
Utsugiao	3 Jun. 2008	Komachien LCC
Eboshiao	3 Jun. 2008	Komachien LCC
Aoiryusei	16 Mar. 2010	Tenkoen Co. Ltd.
RYOKU NH-1	18 Mar. 2011	Nippon Ryokusan Co. Ltd.
RYOKU NH-2	18 Mar. 2011	Nippon Ryokusan Co. Ltd.
RYOKU NH-3	18 Mar. 2011	Nippon Ryokusan Co. Ltd.
NU105	18 Mar. 2011	Tenkoen Co. Ltd.
NU59	9 Mar. 2012	Tenkoen Co. Ltd.
Kunisato35gou	9 Mar. 2012	University of Miyazaki, Miyazaki Prefectural Industrial Support Foundation
Sukawanokagayaki	9 Mar. 2012	Yoshimochi Tamura
Ivanhoe19	25 Mar. 2013	Tenkoen Co. Ltd.

ブルーベリーの育種には全く利用されなかった。しかしながら、2000年代に入り、伊藤（2011）および伊藤・菅原（2006, 2007, 2008a, 2008b, 2009a, 2009b, 2010）は日本産スノキ属植物の探索・収集を行いブルーベリーの育種素材としての検討を行っている。また、クロマメノキと北部ハイブッシュブルーベリー‘Bluecrop’の種間雑種育成（小松ら, 2003）や北部ハイブッシュブルーベリー栽培におけるシャシャンボの台木利用の有効性（國武ら, 2006）が報告されている。さらに、Hiraiら（2010）はSSRマーカーを用いてアラゲナツハゼ（*V. ciliatum*）、ナガボナツハゼ（*V. sieboldii*）およびナツハゼの遺伝的多様性および系統関係を明らかにしている。このように近年、再び、日本産スノキ属植物のブルーベリーの栽培や育種への利用が期待されている。

そこで本研究では、第1章では、日本産スノキ属植物を利用したブルーベリーの育種を行う上での基礎的知見を得ることを目的としてナツハゼおよびシャシャンボの果実の機能性を調査しブルーベリーと比較した。第2章では、日本産スノキ属植物の効率的な染色体倍加方法の確立を目的として、試験管内で増殖した多芽体由来シュートへの有糸分裂阻害物質処理を試みた。第3章では、染色体倍加した四倍体シャシャンボとハイブッシュブルーベリーとの節間交雑による雑種獲得を試み、得られた個体の遺伝学的及び形態学的特性を評価した。最後に第4章では、シャシャンボとハイブッシュブルーベリーの節間雑種の多芽体シュートを用いて、試験管内における高pH適応システムの効率的な選抜方法を検討した。

第 1 章

ナツハゼおよびシャシャンボ果実の機能性評価

緒言

果実や野菜に含まれている抗酸化物質は、がん、心臓病および血管・神経性疾患の主要因となるフリーラジカルによる酸化傷害から、脂質、たんぱく質および核酸を保護することが知られている (Retamales・Hancock, 2012; Howard ら, 2003)。ブルーベリーには抗酸化物質が多量に含まれており (Kalt ら, 1999)、ブルーベリーや他の果実の生理活性物質については多くの研究が行われている (Hervert-Hernández ら, 2011; Wang ら, 2012b)。果実においては多種類の抗酸化物質が同定されているが、アントシアニンと他のポリフェノール類は特に注目を集めてきた (You ら, 2011)。疫学研究の結果、がんはヒトの食生活と密接に関連しており、果物や野菜を多く摂取することでがんのリスクが低減することが明らかとなっている (Steinmetz・Potter, 1991)。ブルーベリー、ストロベリー、ラズベリーおよびクランベリー等のベリー類の果実は発がんの複数の段階を阻害し、がん細胞のアポトーシスを促進することが報告されている (Kraft ら, 2005; Seeram ら, 2006)。

日本にはブルーベリーと近縁のスノキ属植物が 19 種自生している (山崎, 1989)。これらの中でも、落葉性のナツハゼと常緑性のシャシャンボは、関東から九州地方の広範囲に分布

しており，果実は食用に供される（Iwagakiら，1977；國武ら，2006）．ブルーベリーの果肉が白色であるのに対し，ナツハゼとシャシャンボの果肉は赤色を帯びるという特徴を有する．ヨーロッパに自生するビルベリーも果肉色は赤色を呈し果肉と果皮の両方にアントシアニンを含むが，ブルーベリーでは主に果皮にのみアントシアニンが蓄積する（Leeら，2004；Riihinenら，2008；Riberaら，2010）．そのため，ブルーベリー果実の新鮮重当たりのアントシアニン含量はビルベリーと比較して顕著に低いことが報告されている（Riihinenら，2008）．また，ブルーベリー果実の抗酸化能のほとんどは果皮に由来していることから（Wangら，2012b），果実全体の高酸化能を高めるためには，果肉にアントシアニンや他のフェノール化合物を蓄積させることが重要になると考えられる．

以上のことから，果肉の赤いシャシャンボとナツハゼはアントシアニンを豊富に含み，高い抗酸化能を示すことが期待される．しかしながら，これら2種の果実の機能性は明らかでなく，ブルーベリーとの比較も行われていない．そこで本章では，第1にナツハゼ，シャシャンボおよびブルーベリーの果実のアントシアニン含量，総ポリフェノール含量および抗酸化能を調査した．第2に，これらの果実抽出物がヒト骨髄性白血病細胞（HL-60）の増殖とアポトーシスに及ぼす影響を調査した．

材料および方法

1. 植物材料

植物材料としてナツハゼ (Fig. 2A), シャシャンボ (Fig. 2B), 北部ハイブッシュブルーベリー ‘Berkeley’, ‘Darrow’, ‘Duke’, ‘Harrison’ および ‘Spartan’, 南部ハイブッシュブルーベリー (*V. corymbosum* interspecific hybrid) ‘Flordablue’, ‘Georgiagem’, ‘O’Neal’, ‘Reveille’ および ‘Sharpblue’, ラビットアイブルーベリー ‘Gardenblue’, ‘Homebell’, ‘Myers’, ‘Tifblue’ および ‘Woodard’ を供試した. ナツハゼとシャシャンボは福岡県八女市に自生していた個体から成熟果実を採取した. ブルーベリーは, 宮崎大学農学部木花フィールド栽植の約 10 年生の挿し木繁殖個体から成熟果実を採取した. 採取した果実は $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ で凍結後に粉砕機 (CQ-35R, Toshiba, Kawasaki, Japan) で摩砕・混合し, 約 3 分の 1 をアントシアニン分析用に再凍結し, 残りの試料は凍結乾燥機 (DRC-1000 および FDU-2100, EYELA, Tokyo, Japan) を用いて凍結乾燥粉末化し, 分析まで $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ で保存した. 果実の成分分析では抽出と分析を 3 回行い, Tukey の多重検定により統計処理を行った.

2. 総アントシアニン含量と組成

Connor らの方法 (2002a) を一部修正した方法により, 凍結果を 1%塩酸含有メタノール中で粉砕しアントシアニンを抽出した. 抽出液をメンブランフィルター ($0.22\text{ }\mu\text{m}$) でろ過し,

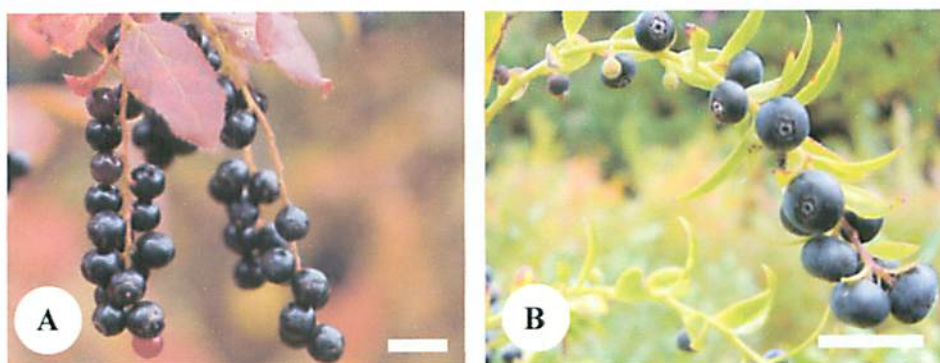


Fig. 2 The fruits of natsuhaze (A) and shashanbo(B). Bars = 10 mm.

高速液体クロマトグラフ (HPLC, Shimadzu, Kyoto, Japan) で分析した。HPLC 分析には, STR ODS-II カラム (Shinwa Kako, Kyoto, Japan) とフォトダイオードアレイ検出器 (SPD-M20A, Shimadzu, Kyoto, Japan) を用い, 2液グラジエント法 (A液: 1%リン酸, B液: 1%リン酸・50%メタノール・0.1%トリフルオロ酢酸) によってアントシアニンを分離した。アントシアニンの同定には Malvidin 3-galactoside, Peonidin 3-glucoside, Cyanidin 3-glucoside および Malvidin 3-glucoside を標品として用いた。上記以外のアントシアニンは, Ballington ら (1987) の報告をもとに推定した。総アントシアニン含量を乾燥果 1 g 当たりの Cyanidin 3-glucoside 相当量で算出するとともに, アントシアニンの組成を決定し, アグリコン別に割合を求めた。

3. 総ポリフェノール含量

果実の総ポリフェノール含量は, フォーリン-チオカルト法 (Singleton・Rossi, 1965) を一部改変した方法で測定した。凍結乾燥果実 20 mg を 80%メタノール中で粉碎してポリフェノールを抽出後, メンブランフィルター (0.45 μ m) でろ過し抽出液とした。抽出液にフェノール試薬 (Sigma, Steinheim, Germany) と飽和炭酸ナトリウム試薬を添加して室温で 30 分間静置後, 分光光度計 (SmartSpec Plus, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて, 760 nm の吸光度を測定した。総ポリフェノール含量は乾燥果 1 g 当たりの没食子酸相当量で表した。

4. 抗酸化能

抗酸化能は 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去活性により評価した。分析は須田の方法 (2000) を一部修正した方法を適用した。凍結乾燥果実 100 mg に 80%エタノール 20 mL を加えて 10 分間攪拌した後、メンブランフィルター (0.45 μm) によりろ過し抽出試料とした。抽出試料に適量の 200 mM MES および 20%エタノールを加えたものに、1.2 mM DPPH (Wako, Osaka, Japan) を添加した。室温で 20 分間静置した後、マイクロプレートリーダー (Viento Multi-Spectrophotometer, Dainippon, Osaka, Japan) を用いて 520 nm の吸光度を測定した。DPPH ラジカル消去能は、乾燥果実 1 g 当たりの Trolox 相当量として表した。

5. HL-60 細胞および細胞培養

ヒト骨髄性白血病細胞 (HL-60) は、宮崎県産業支援財団より提供を受けた。HL-60 は 100 units $\cdot\text{mL}^{-1}$ penicillin と 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ streptomycin を添加した 10% fetal bovine serum を含む RPMI-1640 培地で培養した (Yamasaki ら, 2009)。

6. HL-60 細胞の活性に及ぼす果実抽出物の影響

凍結乾燥果実 1.0 g を 80% (v/v) エタノール中で 30 秒間ホモジナイズ後、ろ紙 (No. 5, Advantec, Tokyo, Japan) でろ過しエバポレーター (37 $^{\circ}\text{C}$) で濃縮した。試料は、再び凍結乾燥した後、Dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解して実験に供試した。ブルーベリー、ナツハゼおよびシャシャンボ果実

抽出物が及ぼす HL-60 細胞の増殖阻害効果を比較するために、HL-60 細胞 (1.0×10^5 cells \cdot mL⁻¹) を含む懸濁培地にエタノール抽出物の DMSO 溶液 (0.5 mg \cdot mL⁻¹) を混合し 24 時間培養した。なお、エタノール抽出物濃度は予備実験の結果を元に定めた。培養終了後、Cell counting kit-8 (Dojindo, Kumamoto, Japan) により細胞活性を測定した。Cell counting kit-8 は細胞増殖または化学物質の感受性試験において、細胞数を測定するキットであり、高感度水溶性ホルマザンを生成するテトラゾリウム塩 WST-8 を発色基質としている。WST-8 は細胞内脱水素酵素により還元され、水溶性のホルマザンを生成する。細胞数と生成するホルマザンの量は直線的な比例関係にあるため、ホルマザンの 520 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (Immuno-Mini NJ-2300, Nippon Intermed, Tokyo, Japan) を用いて測定することにより、生細胞数を計測した。なお、細胞懸濁培地に DMSO のみを添加して培養したものを無処理区とし、無処理区の細胞生存率を 100% とした場合の各処理区の細胞生存率の割合を算出し細胞活性として示した。なお、測定は 5 反復行った。

7. HL-60 細胞および核の形態観察

細胞増殖抑制効果の原因と考えられるアポトーシスの確認を行うため、HL-60 細胞とその核の形態を観察した。細胞の形態観察は、上記の方法で処理した細胞を位相差顕微鏡 (CK40, Olympus, Tokyo, Japan) で観察した。核の形態観察は以下のように行った。すなわち、細胞増殖抑制試験において 24 時間

処理した細胞を遠心分離し(300×g, 5 min), phosphate-buffered saline (PBS) で 2 回洗浄後, ペレット上の細胞に冷却したメタノール (-30°C) を加え, 室温で 30 分間静置した. 次に, 遠心分離を行い(300×g, 5 min), 上清を除去した細胞に 10 μg·mL⁻¹ propidium iodide と 10 μg·mL⁻¹ RNase を含む PBS を加え, 37°C で 30 分間培養し試料とした. 核の形態は蛍光顕微鏡 (BX51, Olympus, Tokyo, Japan) により観察した.

8. DNA 抽出およびアガロースゲル電気泳動

Yamasaki ら (2009) の方法に従い, アガロース電気泳動により核 DNA の断片化を調査した. まず冷却した PBS で細胞を洗浄し, 10 mM EDTA と 0.5% (v/v) Triton X-100 を添加した 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) に溶解した. 次に, 細胞懸濁液に 100 μg·mL⁻¹ RNase A (Sigma, Steinheim, Germany) を添加して 37 °C で 1 時間培養後, 100 μg·mL⁻¹ proteinase K (Sigma, Steinheim, Germany) を加えた. 最後に, Tris-EDTA buffer に溶解した 0.5 M NaCl を含む 50% (v/v) イソプロパノールに DNA を沈殿させ試料とした. 2% (w/v) agarose gel により電気泳動を行った後, SYBR green で染色し核 DNA の断片化を検出した.

結果

1. 総アントシアニン含量と組成

全ての果実抽出物において 14 種類のアントシアニンを検出した。‘Homebell’ は最も高いアントシアニン含量を示したが (26.5 mg cyanidin 3-glucoside equivalents · g⁻¹ DW), ナツハゼ (19.1 mg cyanidin 3-glucoside equivalents · g⁻¹ DW), ‘Myers’ (24.9 mg cyanidin 3-glucoside equivalents · g⁻¹ DW) および ‘Gardenblue’ (20.7 mg cyanidin 3-glucoside equivalents · g⁻¹ DW) との間に有意差は認められなかった (Fig. 3A)。ブルーベリーにおいては, ラビットアイブルーベリーがハイブッシュブルーベリーと比較して高いアントシアニン含量を示した。また, シャシャンボのアントシアニン含量は北部ハイブッシュブルーベリーと同程度であった。次に, アグリコン別にアントシアニンの組成を調査した (Fig. 3B)。北部ハイブッシュブルーベリーでは delphinidin の割合が最も高く, 39.6% (‘Darrow’) ~ 26.6% (‘Duke’) を示した。南部ハイブッシュブルーベリーでは delphinidin [32.3% (‘O’Neal’, ‘Sharpblue’) ~ 19.5% (‘Gerogeagem’)], または malvidin 27.8% (‘Reveille’) ~ 24.0% (‘O’Neal’) 含量が高い値を示した。ラビットアイブルーベリーにおいても, malvidin または delphinidin 含量が高く, それぞれ 33.5% (‘Homebell’) ~ 26.2% (‘Woodard’) と 28.0% (‘Woodard’) ~ 18.0% (‘Tifblue’) であった。シャシャンボとナツハゼにおいは delphinidin 含量が最も高く, それぞれ 32.9% と 26.6% を示した。また, ナツハゼは malvidin 含量も高い値を示したが (20.3%), シャシャンボは cyanidin を多く含むことが明らかとなった (31.5%)。

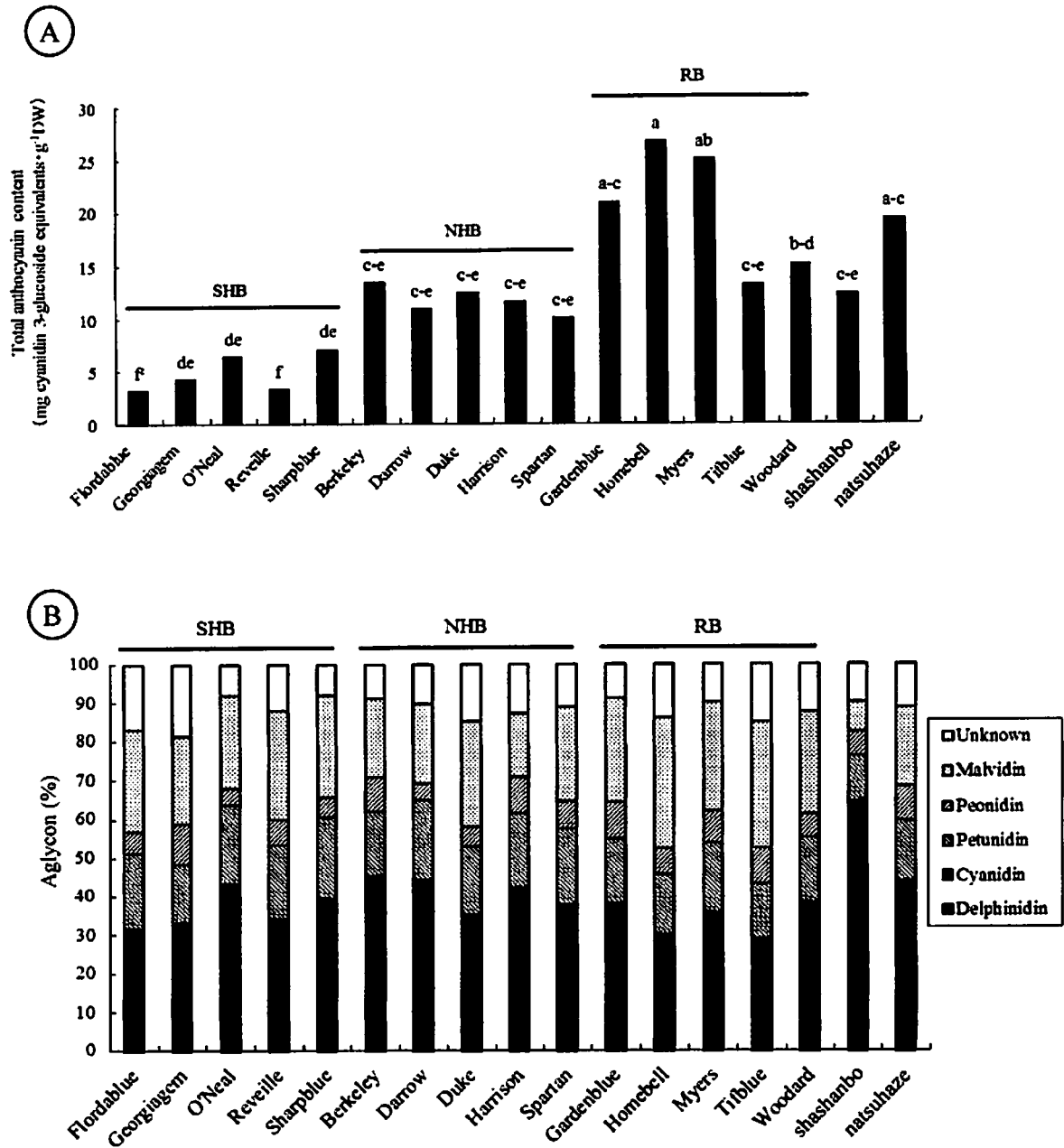


Fig. 3 Total anthocyanin content (A) and rate of each anthocyanidin in total anthocyanin content (B) of fruits in blueberry cultivars and wild species. SHB: Southern highbush blueberry. NHB: Northern highbush blueberry. RB: Rabbiteye blueberry. ²Different letters represent significant differences in Tukey's multiple range test, 1% level.

2. 総ポリフェノール含量

ナツハゼ ($65.5 \text{ mg gallic acid} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$) とシャシャンボ ($38.8 \text{ mg gallic acid} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$) の総ポリフェノール含量は、ブルーベリーと比較して有意に高い値を示した (Fig. 4). ブルーベリーにおいては、総じてハイブッシュブルーベリーと比較してラビットアイブルーベリーの総ポリフェノール含量が高い値を示した. ブルーベリーにおいて最も高い値を示したラビットアイブルーベリー 'Gardenblue' ($35.1 \text{ mg gallic acid} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$) の総ポリフェノール含量は、最も低い値を示した南部ハイブッシュブルーベリー 'Reveille' ($12.0 \text{ mg gallic acid} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$) の約 3 倍であった.

3. 抗酸化能

ナツハゼが最も高い抗酸化能をもつことが明らかとなった. また、シャシャンボの抗酸化能はラビットアイブルーベリーと同程度であった. 一方で、ブルーベリーにおいては、ラビットアイブルーベリーがハイブッシュブルーベリーと比較して高い抗酸化能を示した. また、抗酸化能には種または品種間により顕著な差が認められ、最も高い値を示したナツハゼの抗酸化能 ($456.2 \text{ } \mu\text{mol Trolox equivalents} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$) は最低値を示した南部ハイブッシュブルーベリー 'Reveille' ($52.5 \text{ } \mu\text{mol Trolox equivalents} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$) の約 8 倍であった (Fig. 5). さらに、抗酸化能と総ポリフェノール含量 ($r = 0.96$, $n = 17$) および抗酸化能と総アントシアニン含量 ($r = 0.58$, $n = 17$) には正の相関が認められた.

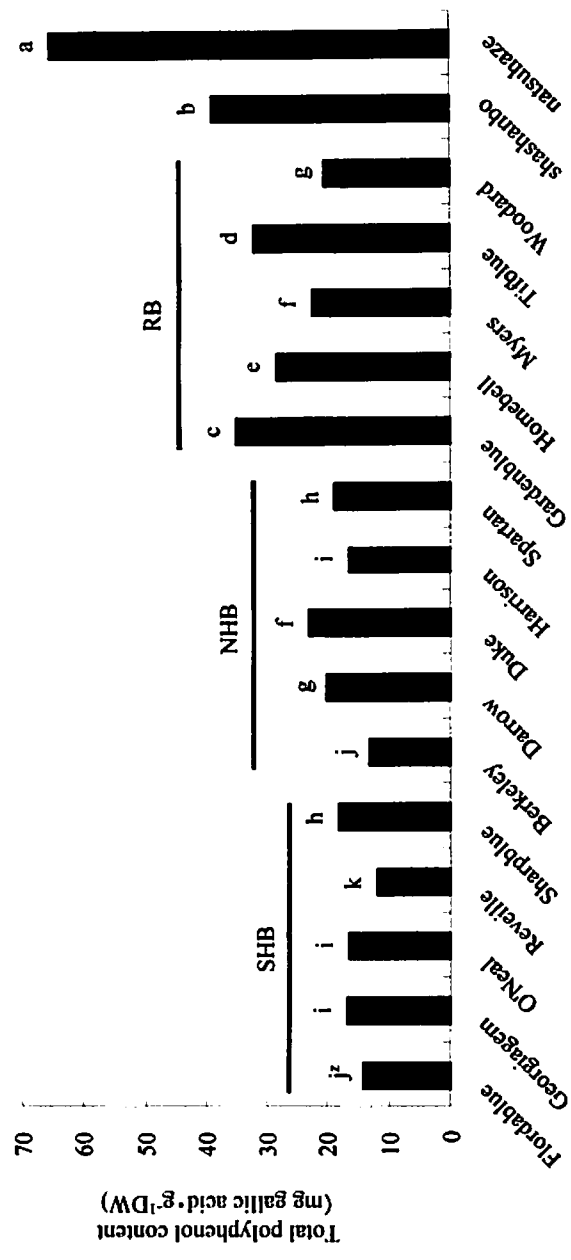


Fig. 4 Total polyphenol content of fruits in blueberry cultivars and wild species. SHB: Southern highbush blueberry. NHB: Northern highbush blueberry. RB: Rabbiteye blueberry. ^zDifferent letters represent significant differences in Tukey's multiple range test, 1% level.

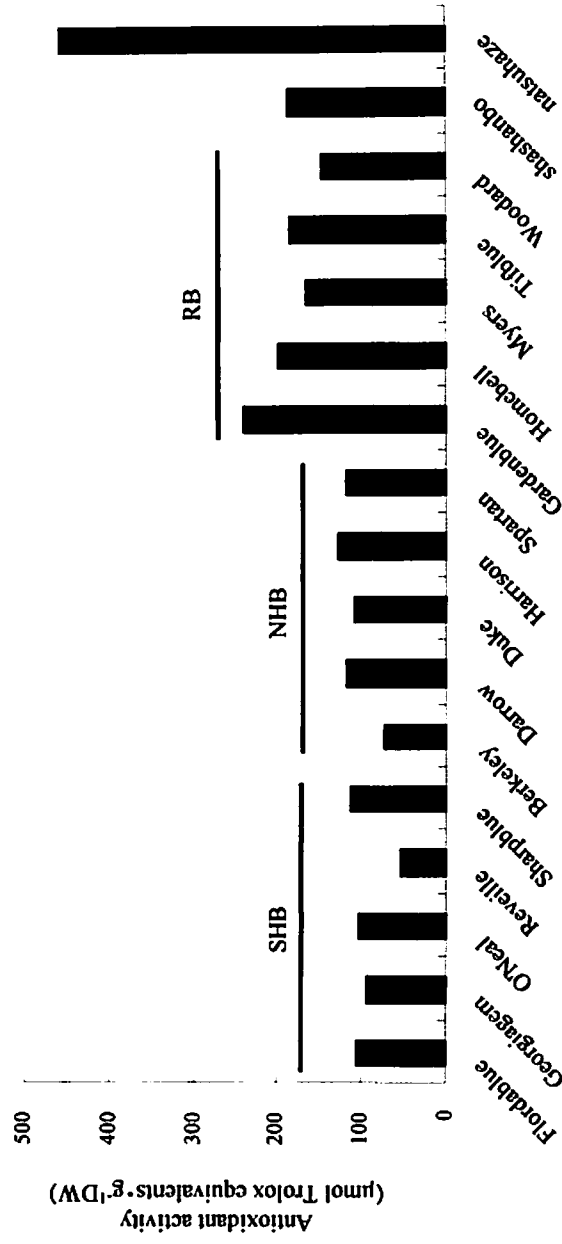


Fig. 5 Antioxidant activity of fruits in blueberry cultivars and wild species. SHB: Southern highbush blueberry. NHB: Northern highbush blueberry. RB: Rabbiteye blueberry.

4. HL-60 細胞の増殖に及ぼす果実抽出物の影響

HL-60 細胞の増殖に及ぼす果実抽出物の影響には種間差異が認められた (Fig. 6). ナツハゼとシャシャンボはブルーベリーと比較して有意に高い細胞増殖抑制効果を示し, HL-60 細胞の細胞活性はそれぞれ, 19.5%と 41.0%であった. 一方で, 本条件においてはブルーベリー果実に細胞増殖抑制効果は認められなかった.

5. HL-60 細胞のアポトーシス誘導に及ぼすナツハゼ果実抽出物の影響

ナツハゼ果実抽出物と共存培養した HL-60 細胞の形態を位相差顕微鏡で観察した結果, 無処理区では正常な細胞が多く確認されたのに対し, 果実抽出物処理区では, アポトーシス小体と思われる形態が観察された (Fig. 7A, B). このことから果実抽出物は細胞増殖抑制効果と同時に, 細胞致死効果を示すことが示唆された. さらに, 蛍光顕微鏡下で核の形態を観察したところ, 果実抽出物処理区において, アポトーシス細胞の典型的な形態である核の断片化が多く観察された (Fig. 7C, D). 次に, ナツハゼ果実抽出物が誘導する細胞死がアポトーシスによるものか確認するため, DNA ラダーの生成について調査した結果, 明瞭な DNA ラダーが認められ, アポトーシスが誘導されたことが確かめられた (Fig. 8). また, シャシャンボの果実抽出物においても, 同様に DNA ラダーが確認された.

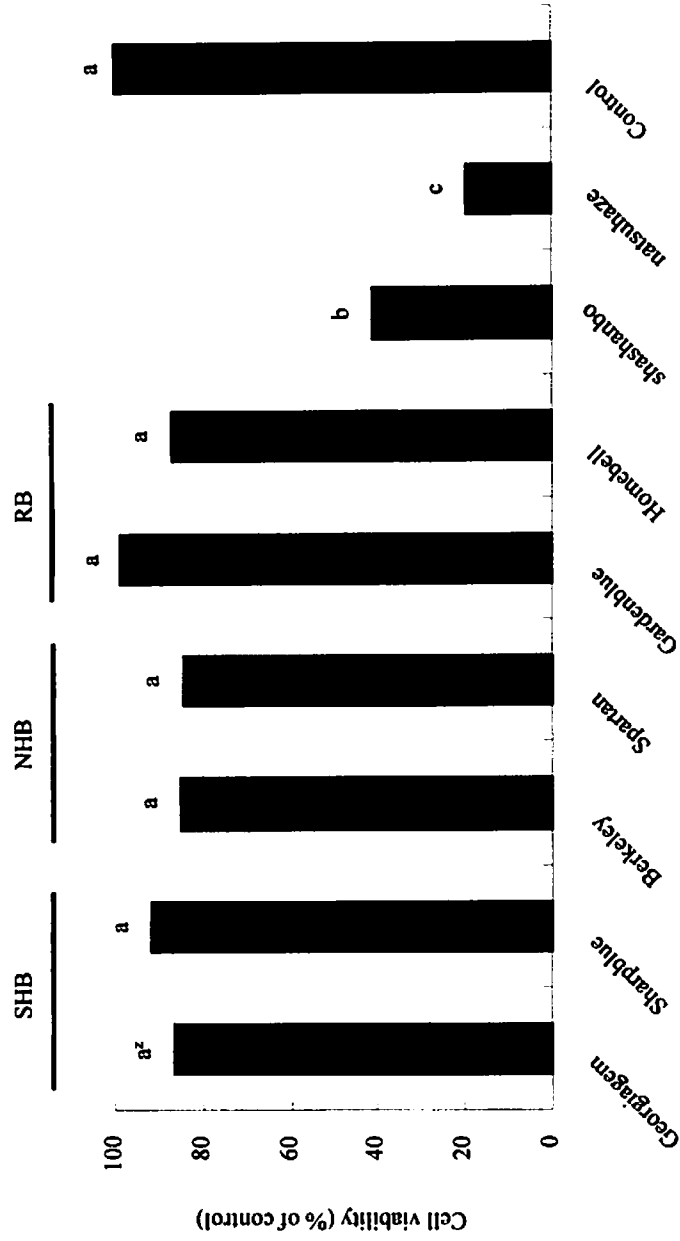


Fig. 6 Effect of ethanol extracts on the viability of HL-60 cells. SHB: Southern highbush blueberry. NHB: Northern highbush blueberry. RB: Rabbiteye blueberry. ²Different letters represent significant differences in Tukey's multiple range test, 1% level.

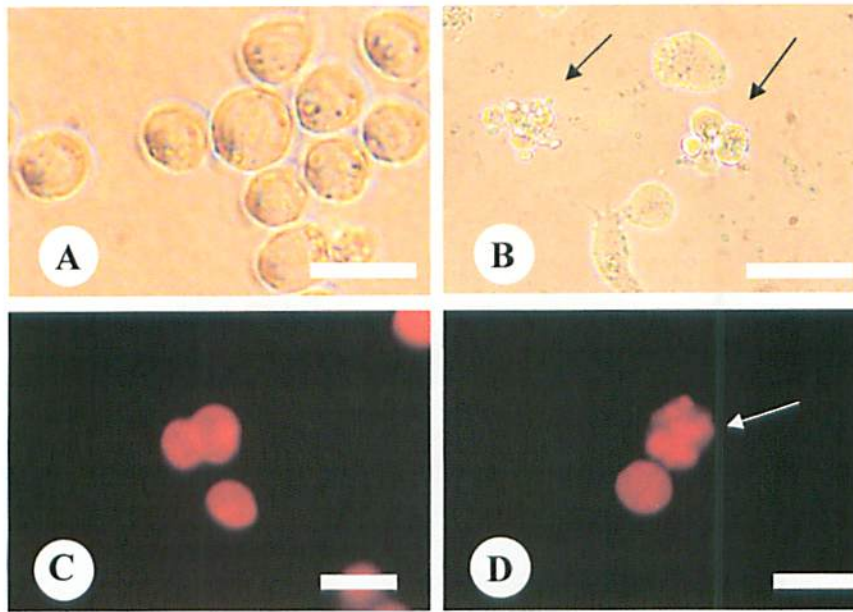


Fig. 7 Effect of natsuhaze ethanol extract on morphological change of HL-60 cells (A, B) and nuclei (C, D). A, C: Control, B, D: HL-60 cells treated with ethanol extract of natsuhaze at $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Black arrows indicate the typical apoptotic cells, and a white arrow indicates the nuclear condensation. Bars = $20 \text{ }\mu\text{m}$ (A, B) and $0.5 \text{ }\mu\text{m}$ (C, D).

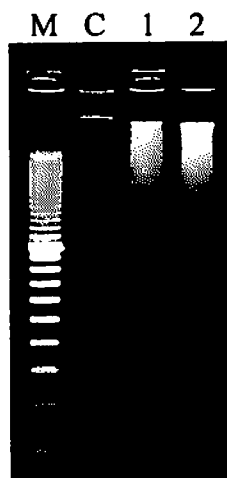


Fig. 8 Analysis of DNA fragmentation patterns by agarose gel electrophoresis. DNA was extracted from HL-60 cells incubated with $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ fruit ethanol extract for 6 h. M: DNA marker, C: control, 1: shashanbo, 2: natsuhaze.

考察

果実や野菜を食事に取り入れることがヒトの健康に有益なことは広く知られている (Hervert-Hernández, 2011). 果実や野菜は抗酸化能に大きく寄与しており, 食の品質指標となっている (Saura-Calixto, 2009). 食物の抗酸化能には, ビタミン, ポリフェノール, カロテノイド等の抗酸化物質が複合的に関与しているが (Liu ら, 2008), 果実と野菜に含まれる主要な抗酸化物質はポリフェノールである (Saura-Calixto, 2010). 体内におけるフリーラジカルの生成は加齢に伴う様々な病気の発生要因となるが (Finkel ら, 2000; Blomhoff ら, 2006; Gosslau・Chen, 2004; Ghahremani-majd ら, 2012), ポリフェノールは抗酸化物質として働き, フリーラジカルを不活化することが確認されている (Schroeter ら, 2002). そのため, 高い抗酸化能を有する果実や野菜の摂取は, 発がんのリスク低減につながると考えられている (Steinmetz・Potter, 1991). 細胞培養系は, がん化プロセスにおける果実中のフィトケミカルの影響を調査するために広く利用されてきた (Prior・Joseph, 2005). 以上のことから, 本章では, 総アントシアニン含量, 総ポリフェノール含量および抗酸化能の分析に加えて, 果実抽出物が HL-60 細胞の増殖抑制に及ぼす影響について, 細胞培養系を用いて調査した.

本章において, ナツハゼ, シャシャンボおよびラビットアイブルーベリーの総アントシアニン含量に有意な差は認めら

れなかった。一方で，ナツハゼとシャシャンボの総ポリフェノール含量はブルーベリーと比較して高いことが明らかとなった。これまでに，他のスノキ属野生種の果実においてもブルーベリーと比較して高いポリフェノール含量を示すことが報告されている (Giovanelli・Buratti, 2009; Koca・Karadeniz, 2009)。ブルーベリーにおける高い抗酸化能は，アントシアニン含量と総ポリフェノール含量の両方に高い相関が認められる (Giovanelli・Buratti, 2009; Youら, 2011)。しかしながら，本章では総ポリフェノール含量と抗酸化能にのみ高い相関が認められており，Koca・Karadeniz (2009) と Wangら (2012a) の報告と一致した。

本章の結果，ナツハゼとシャシャンボはブルーベリーと比較して HL-60 細胞の増殖抑制効果が高いことが明らかとなった。特に，高い抗酸化能を示したナツハゼはアポトーシスにより HL-60 細胞の増殖が強く抑制されたものと推察された。しかしながら，シャシャンボにおける HL-60 細胞の増殖抑制効果は，抗酸化能との関連が明確でないため，今後の詳細な調査が必要である。Katsubeら (2003) は，ビルベリー果実抽出物および delphinidin または malvidin 型アントシアニンがアポトーシス誘導により HL-60 細胞の成長を阻害することを報告している。本章では， $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ナツハゼ果実抽出物との 24 時間の共存培養により HL-60 細胞の増殖は顕著に抑制されたが，同濃度のビルベリー果実抽出物では細胞増殖抑制効果は認められていない (Katsubeら, 2003)。このことから，ナツハゼの HL-60 細胞増殖抑制効果はビルベリーと比較して

高い可能性が示唆された。一方，本章においては，総アントシアニン含量が最も高い値を示したラビットアイブルーベリーの HL-60 細胞増殖抑制効果は確認されなかった。以上のことから，ナツハゼ果実に含まれている HL-60 細胞増殖抑制効果に寄与した物質は，アントシアニンではない可能性が考えられる。

ブルーベリーの果実には，アントシアニン，ケルセチン，ケンフェロール，ミルセチン，クロロゲン酸，プロアントシアニジンなどのフェノール化合物が含まれ，これらが抗酸化能に寄与している (Retamales・Hancock, 2012)。他のベリー類と比較して高い抗酸化能を示すリンゴンベリー，クランベリー (*V. oxycoccus*) およびクロマメノキの抗酸化能には，それらの果実に高濃度に含まれるカテキンまたはプロアントシアニジンが関与していると考えられている (Määttä-Riihinen ら, 2004, 2005; Zheng・Wang, 2003)。実際に，リンゴンベリーから精製されたプロアントシアニジンは，高い抗酸化能を有することが報告されている (Ho ら, 1999)。また，プロアントシアニジン含有量の高いスノキ属植物の果実抽出物について，試験管内におけるヒトがん細胞の増殖阻害やアポトーシス誘導効果が認められている (Seeram ら, 2006; Nandakumar ら, 2008)。さらに，試験管内においてクランベリーの果実抽出物を処理した乳房がんモデルを用いた研究では，細胞周期停止を伴うアポトーシスの用量依存的誘導が報告されている (Neto, 2007)。また，ブルーベリー野生種のプロアントシアニジン画分およびブルーベリー栽培種のプロアント

シアニジンに富む 2 種類の類似画分が前立腺がん細胞 (LNCaP) の増殖を阻害することが報告されている (Schmidt ら, 2006). さらに, 最近, ナツハゼの成熟果実にブルーベリーの約 7 倍のプロアントシアニジンが含まれ, ナツハゼ果実の抗酸化能がブルーベリーと比較して有意に高いことが明らかにされている (津田ら, 印刷中).

以上の結果, ナツハゼ果実のエタノール抽出物に含まれるプロアントシアニジンやアントシニンを含む総ポリフェノールが高い抗酸化能に寄与しており, それらがアポトーシス誘導による HL-60 細胞の増殖抑制に関与しているものと推察された. 果実に含まれる生理活性物質には遺伝子型による多様性が認められるが, これらの物質は量的遺伝を示し (Connor ら, 2002a, 2002b), 遺伝様式が複雑なため, 生理活性物質の改良に特化した育種は行われてこなかった (Rowland ら, 2011). しかしながら, 近年, ブルーベリーを含むベリー類の育種において, フラボノイド含量と抗酸化能は重要な目標形質となりつつある (Wang ら, 2012a). したがって, 本章において高い抗酸化能を示し HL-60 細胞の増殖抑制効果が明らかとなったナツハゼおよびシャシャンボは, 高い機能性を有するブルーベリー品種育成のための遺伝資源として有望と考えられる.

摘要

日本産スノキ属植物とブルーベリー栽培品種の機能性成分を調査した。その結果、ナツハゼ、シャシャンボおよびラビットアイブルーベリーの総アントシアニン含量に有意な差は認められなかった。一方で、ナツハゼとシャシャンボの総ポリフェノール含量はブルーベリーと比較して高いことが明らかとなった。また、ナツハゼとシャシャンボはブルーベリーと比較してHL-60細胞の増殖抑制効果が高いことが判明した。特に、高い抗酸化能を示したナツハゼはアポトーシスによりHL-60細胞の増殖が強く抑制されたものと推察された。以上の結果、ナツハゼおよびシャシャンボ果実に含まれるアントシアニンを含む総ポリフェノールが抗酸化能に寄与しており、それらがHL-60細胞の増殖抑制に関与しているものと推察された。

第 2 章

スノキ属植物における効率的な染色体倍加方法の検討

緒言

現在、日本で栽培されているブルーベリーは、四倍体の北部ハイブッシュブルーベリーと南部ハイブッシュブルーベリーおよび六倍体のラビットアイブルーベリーの 3 種であり、これらの多くは米国で育成されたものである。一方、我が国には、ブルーベリーと近縁のスノキ属植物が 19 種自生しており（山崎，1989）、そのほとんどは二倍体である。Iwagaki ら（1977）は、古くからこれら日本産野生種の育種素材としての有望性を指摘してきたが、ブルーベリーの品種改良にはほとんど利用されなかった。ブルーベリーやその近縁野生種であるビルベリーは、ポリフェノールなどの抗酸化成分を多く含む機能性果実として注目されている（Kalt ら，1999）。第 1 章において、日本に自生するナツハゼとシャシャンボの果実が高い抗酸化能を有しており、ヒト白血球細胞の増殖を抑制することを報告した（Tsuda ら，2013）。近年、小松ら（2003，2006）は、日本に自生し果実のポリフェノール含量と抗酸化活能が栽培種よりも高いクロマメノキと、食味に優れる北部ハイブッシュブルーベリー ‘Bluecrop’ との種間交雑を行い、両親の中間の果実特性を有する雑種を獲得しており、これらが食味に優れ機能性に富む新品種育成のための育種母本にな

り得ると報告している。

アメリカでは，ブルーベリー育種の開始以来，様々な近縁野生種が品種改良に利用されてきた (Chavez・Lyrene, 2009a). しかしながら，スノキ属植物においては，三倍体接合体の崩壊による強いトリプロイドブロックが原因で，二倍体野生種と四倍体のハイブッシュブルーベリーとの交雑は容易でない (Sharpe・Sherman, 1971). 一方，スノキ属植物における同倍数体間の交雑においては，稔性を有する樹勢の強い雑種が多数得られている (Lyrene・Ballington, 1986). そのため，二倍体野生種を人為的に染色体倍加することで，四倍体との交雑が容易になると考えられる (Chavez・Lyrene, 2009b). 実際に，二倍体の *V. elliotii* を花粉親として四倍体の南部ハイブッシュブルーベリー ‘O’Neal’ と交雑した結果，受粉 1 花当たりの獲得実生数が 0.01 であったのに対し，コルヒチン処理により得られた *V. elliotii* の同質四倍体を花粉親とした場合では 3.86 であった (Dweikat・Lyrene, 1991).

コルヒチンによる人為的な倍数体作出方法が開発されてから (Blakeslee・Avery, 1937), 様々な有糸分裂阻害物質が染色体倍加に利用されてきた. ジニトロアニリン系除草剤であるオリザリン [3,5-ジニトロ-4-(ジプロピルアミノ)ベンゼンスルホンアミド] ($C_{12}H_{18}N_4O_6S$) は，低濃度で多くの染色体倍加個体が得られること (Väinölä, 2000), 奇形器官や成育異常の発生が少ないこと (van Tuyl ら, 1992) などの理由により，近年コルヒチンと同様に染色体倍加に利用されている. 実際に，リンゴ (Bouvier ら, 1994), ナシ (Bouvier ら, 2002),

バナナ (Van Duren ら, 1996) およびキンカン (八幡ら, 2004) など, 多くの果樹でオリザリンによる染色体倍加が行われている. スノキ属植物においても, 種子 (Chavez・Lyrene, 2009b; Miyashita ら, 2009; Rousi, 1967) や成長点 (Dweikat・Lyrene, 1989; Moore ら, 1964) にコルヒチンを処理することにより染色体倍加個体が作出されており, 著者もシャシャンボ種子へのコルヒチン処理により数個体の染色体倍加個体を獲得している (津田, 2007). しかしながら, これまでにスノキ属においてコルヒチン以外の有糸分裂阻害物質の有効性は全く検討されていない. さらに, スノキ属植物の染色体倍加個体の誘導率に言及した報告は少なく, 効率的な染色体倍加方法は確立されていない.

そこで本章では, まず, スノキ属植物における染色体倍加方法を確立するために, 栽培品種の多芽体由来シュートをオリザリンとコルヒチンに浸漬処理し, 染色体倍加に最適な処理濃度と時間を検討した. 次に, 栽培品種で確立した最適条件を用いて, 日本に自生するスノキ属植物 4 種の染色体倍加を試みた.

材料および方法

1. 栽培品種におけるコルヒチンおよびオリザリン処理条件の検討

植物材料として, 北部ハイブッシュブルーベリー 'Berkeley'

($2n=4x=48$)を供試した。Tetsumuraら(2008)と山内(佐藤)ら(2012)の方法に従い、発芽直前の腋芽を滅菌した後、2%スクロース、0.8%寒天および $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ zeatinを添加したMW培地[MS培地(Murashige・Skoog, 1962)とWPM培地(Wolfeら, 1983)を等量混合](pH4.8)に置床し、 25°C 、24時間連続照明下($38\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)で多芽体を誘導した。2か月ごとに同培地で多芽体を継代培養し、実験に必要なシュート数になるまで継代培養を繰り返した。新たに発生したシュートを約40 mm長に調製し、 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ のフィルター(Sartorius, Goettingen, Germany)で滅菌したコルヒチン溶液またはオリザリン溶液に浸漬した。なお、オリザリン溶液はDMSO(最終濃度2%)で溶解した。コルヒチン処理は、4種類の濃度(0.001, 0.005, 0.1 および 0.2%)と10種類の処理時間(0.5, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72 および 96時間)を組み合わせた20処理区とした。一方、オリザリン処理は、2種類の濃度(0.001と0.005%)と3種類の処理時間(12, 24 および 48時間)を組み合わせた6処理区を設けた。なお、いずれの処理区も30本のシュートを供試した。コルヒチンまたはオリザリン処理後のシュートを、滅菌水で3回洗浄し、20 mmずつに切り分け、前述した培地上に置床した。培養2か月後に、処理したシュートの腋芽から発生したシュートのうち1本を無作為に選び、フローサイトメーター(FCM; EPICS XL, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA)で倍数性を解析した。一部改良を加えたYahataら(2005a)の方法に従い、採取した試料50 mgに1 mL chopping buffer [$6.30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2SO_3 , $10.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Triton

X-100, $6.06 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ トリス塩酸, $10.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ RNase, $50.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Polyvinylpyrrolidone (PVP-10), pH 7.5] を加え, シャーレ上で約 100 回細かく刻み, $20 \mu\text{m}$ Cell Trics filter (Partec, Münster, Germany) によりろ過した. さらに, 測定直前に, ろ液に $50 \mu\text{L}$ の $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Propidium iodide (PI) 溶液を加えて混合することで核を染色し蛍光強度を測定した.

染色体倍加個体と推測されたものを, 山内(佐藤)ら(2012)の方法に従い順化した. すなわち, FCM 解析を行ったシュートと同位置の腋芽から新たに伸長したシュートを採取し, ピートモスとボラ土を等量混合したセル成型トレー ($20 \times 20 \times$ 深さ 40 mm / セル) に根の無い状態で直接挿し木した. 挿し木後, セル成型トレーはプラスチック製の密閉容器に入れ, 25°C , 相対湿度 $90 \sim 100\%$, $30 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ の 12 時間照明条件下のインキュベータ内で発根と順化を同時に行った. また, 順化 2~4 週間後に, 植物体から根端 0.5 cm を採取し, 一部修正を加えた Fukui (1996) の方法に従い染色体を観察した. すなわち, 採取した根端を 2 mM 8-ヒドロキシキノリンで室温, 2 時間前処理後, 固定液 (エタノール : 酢酸 = 3 : 1) で室温, 1 時間固定した. 固定後, 根端を蒸留水で 30 分間水洗して固定液を取り除き, 3%セルラーゼ“オノズカ”RS (Yakult, Tokyo, Japan), 2%マセロザイム R-200 (Yakult, Tokyo, Japan), 1%ペクトリアーゼ Y-23 (Kikkoman, Noda, Japan) および 200 mM EDTA を含む酵素液に 37°C で 30 分間浸漬した. 酵素処理後, 根端をスライドガラス上に移し, 固定液を加えて細胞を拡散させ, 室温で乾燥させた後 2%ギムザ液で 30 分間染色し, 水

洗後に乾燥させて染色体標本を作成した。これらの染色体標本について、光学顕微鏡 (BX51, Olympus, Tokyo, Japan) を用いて染色体数を数えた。なお、順化後の倍加個体は、ラビットアイブルーベリー台木に接ぎ木して育成した。

2. オリザリン処理による日本産スノキ属植物の染色体倍加

ナツハゼ ($2n=2x=24$)、スノキ (*V. smallii*) ($2n=2x=24$)、コケモモ ($2n=2x=24$) およびクロマメノキ ($2n=6x=72$) の腋芽を用いて、前記と同様の方法で多芽体を誘導した。ナツハゼとクロマメノキは新潟県立植物園、スノキは樹美庵 (園芸店)、コケモモは湯沢園芸 (園芸店) より導入した。これらの多芽体から得たシュートを、前記と同様の方法でオリザリン処理を行った。処理条件は、'Berkeley' における実験結果に基づき、 $0.005\% \cdot 24$ 時間とし、 $20 \sim 90$ 本のシュートを供試した。培養 2 か月後に前記と同様に、得られたシュートの倍数性を解析し、発根処理と順化を同時に行った。また、倍数性キメラ個体に関しては、順化後に育成して染色体倍加個体を分離した後、ラビットアイブルーベリー 'Homebell' 台木に接ぎ木し生育を促進させた。なお、第 1 章において高い機能性が明らかになったシャシャンボは、多芽体誘導が困難であり、本試験に供試することができなかった。

結果

1. 栽培品種におけるコルヒチンおよびオリザリン処理条件の検討

コルヒチンとオリザリンを処理したシュートは、無処理区と比較して発芽が遅く、その傾向は処理濃度の上昇と処理時間の延長により、さらに強くなった。しかし、処理2か月後には個体数に差異があるものの、すべての処理区でシュートが得られた。

コルヒチン処理試験の結果 (Table 2), 0.001%の12と24時間処理では全てのシュートが生存していたが、48時間以上の処理区では処理時間が長くなるにつれて生存率が減少し、96時間処理では46.7%であった。0.005, 0.1 および 0.2%では、処理時間がシュートの生存率に及ぼす影響に一定の傾向は見られなかった。生存シュートのFCM解析を行った結果 (Fig. 9A-C), 四倍体, 八倍体および倍数性キメラ (四倍体と八倍体) が認められた。0.001%の12と24時間処理では、すべてのシュートが四倍性を示した。しかし、48時間区では20.0%の倍数性キメラが誘導され、72時間区では6.7%のシュートが八倍体であった。0.005%のすべての処理区で倍数性キメラ (6.7~33.3%) が得られた。それに対し、八倍体は48時間以上の処理区で得られ、96時間が13.3%と最も高い染色体倍加個体誘導率を示した。0.1%区では、4時間処理で10.0%の倍数性キメラが得られたものの、染色体倍加個体は全く誘導できなかった。0.2%区では、2時間処理以外で染色体倍加個体は得られ

Table 2 Effect of *in vitro* colchicine treatment on survival rate and chromosome doubling of northern highbush blueberry 'Berkeley'.

Colchicine concentration(%)	Duration (h)	No. of explants treated	No. of explants survived	Survival rate(%) ^z	Ploidy level		
					4x (%)	4x+8x (%)	8x (%)
Control	0	30	30	100	30 (100)	0 (0)	0 (0)
	12	30	30	100	30 (100)	0 (0)	0 (0)
	24	30	30	100	30 (100)	0 (0)	0 (0)
0.001	48	30	29	96.7	22 (73.3)	6 (20.0)	1 (3.3)
	72	30	23	76.7	19 (63.3)	2 (6.7)	2 (6.7)
	96	30	14	46.7	13 (43.3)	1 (3.3)	0 (0)
	12	30	20	66.7	15 (50.0)	5 (16.7)	0 (0)
	24	30	28	93.3	23 (76.7)	5 (16.7)	0 (0)
0.005	48	30	17	56.7	12 (40.0)	4 (13.3)	1 (3.3)
	72	30	29	96.7	26 (86.7)	2 (6.7)	1 (3.3)
	96	30	29	96.7	15 (50.0)	10 (33.3)	4 (13.3)
	0.5	30	29	96.7	28 (93.3)	1 (3.3)	0 (0)
	1	30	28	93.3	27 (90.0)	1 (3.3)	0 (0)
0.1	2	30	28	93.3	28 (93.3)	0 (0)	0 (0)
	4	30	30	100	27 (90.0)	3 (10.0)	0 (0)
	6	30	23	76.7	21 (70.0)	2 (6.7)	0 (0)
	0.5	30	29	96.7	26 (86.7)	2 (6.7)	1 (3.3)
	1	30	24	80.0	23 (76.7)	0 (0)	1 (3.3)
0.2	2	30	30	100	25 (83.3)	5 (16.7)	0 (0)
	4	30	24	80.0	19 (63.3)	4 (13.3)	1 (3.3)
	6	30	24	80.0	18 (60.0)	4 (13.3)	2 (6.7)

Explants were treated with colchicine treatment. Then explants were cultured on MW medium.

Two month after culture, survival rate of explants were determined and new shoot from axillary bud were analyzed using flow cytometry.

^z(No. of explants survived/No. of explants treated) × 100.

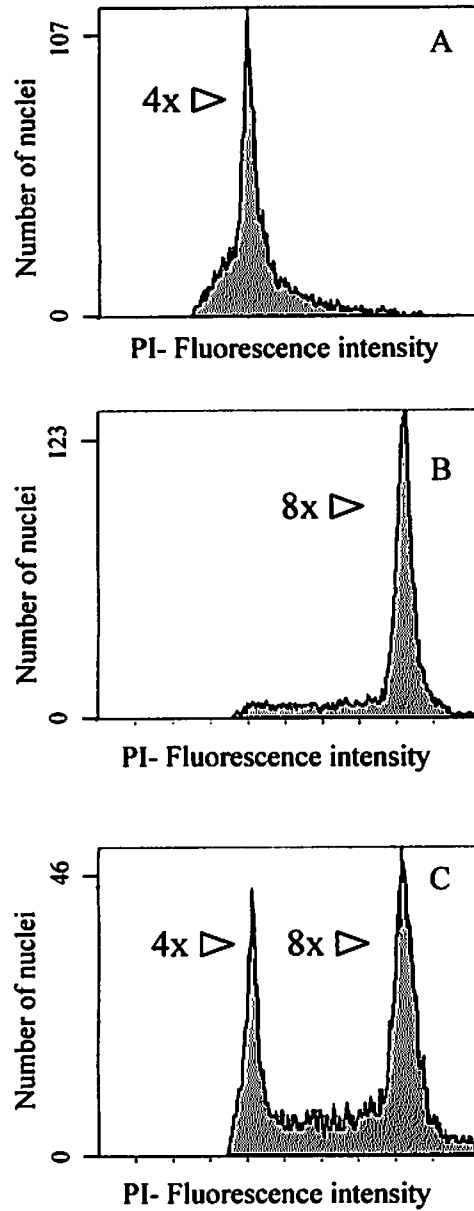


Fig. 9 Flow cytometry analysis of new shoot elongated from the buds of colchicine-treated plants of northern highbush blueberry 'Berkeley'.
 A: Tetraploid, B: Octoploid, C: Cytochimera (tetraploid and octoploid).

たが、その誘導率は6時間処理の6.7%が最高であった。

オリザリン処理を行った結果 (Table 3), 0.001%区の生存率は12, 24および48時間処理区において、それぞれ100, 100および86.7%であった。一方、0.005%区では、12と24時間区が90.0と80.0%の生存率であったのに対し、48時間区では3.3%と非常に低い生存率であった。0.001%区では、染色体倍加個体が48時間区の1個体(3.3%)のみであった。しかし、0.005%区では、12と24時間処理でそれぞれ13.3と23.3%の染色体倍加個体が得られた。

FCM解析によって八倍体と推測された個体を順化し、四倍体とともに根端の染色体数を観察した結果、それぞれ96と48本の染色体数を有する八倍体と四倍体であることが確認され、FCM解析の結果と一致した (Fig. 10)。コルヒチン処理によって得られた八倍体は、接ぎ木後2年を経過しても順調な生育を示している (Fig. 11A)。

以上の結果、スノキ属植物においては、0.005%・24時間のオリザリン処理を行うことにより、効率的に染色体倍加個体を誘導できるものと思われた。

2. オリザリン処理による日本産スノキ属植物の染色体倍加

0.005%・24時間の条件で、日本産スノキ属植物4種にオリザリン処理を行った結果、生存率は80.0~100%であり、種間による差異が認められた (Table 4)。FCMで得られたシュートを解析したところ、種によって染色体倍加個体の誘導率が異なった。すなわち、スノキでは四倍体誘導率が5.6%で、倍

Table 3 Effect of *in vitro* oryzalin treatment on survival rate and chromosome doubling of northern highbush blueberry 'Berkeley'.

Oryzalin concentration(%)	Duration (h)	No. of explants treated	No. of explants survived	Survival rate(%) ²	Ploidy level		
					4x (%)	4x+8x (%)	8x (%)
Control	0	30	30	100	30 (100)	0 (0)	0 (0)
	12	30	30	100	30 (100)	0 (0)	0 (0)
0.001	24	30	30	100	23 (76.7)	7 (23.3)	0 (0)
	48	30	26	86.7	22 (73.3)	3 (10.0)	1 (3.3)
	12	30	27	90.0	18 (60.0)	4 (13.3)	4 (13.3)
0.005	24	30	24	80.0	16 (53.3)	1 (3.3)	7 (23.3)
	48	30	1	3.3	1 (3.3)	0 (0)	0 (0)

Explants were treated with oryzalin treatment. Then explants were cultured on MW medium.

Two month after culture, survival rate of explants were determined and new shoot from axillary bud were analyzed using flow cytometry.

²(No. of explants survived/No. of explants treated) × 100.

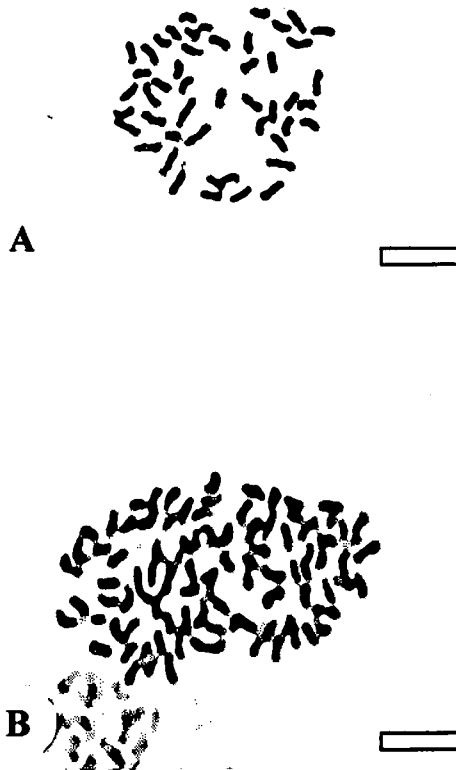


Fig. 10 Chromosome observation of colchicine-treated plants of northern highbush blueberry 'Berkeley'. A: Tetraploid ($2n = 4x = 48$), B: Octoploid ($2n = 8x = 96$). Bars = 10 μm .



Fig. 11 Two autoployploids derived from *in vitro* oryzalin-treatment. A: 'Berkeley' (Octoploid), B: natsuhaze (Tetraploid). Observation was conducted after 2 years of grafting on rabbiteye blueberry 'Homebell'. Bars = 10 cm.

Table 4 Effect of *in vitro* oryzalin treatment on survival rate and chromosome doubling in four species of *Vaccinium*.

Species	No. of		Survival rate(%) ^y	Ploidy level		
	explants treated	explants survived		2x [6x]	2x+4x [6x+12x]	4x [12x]
<i>V. oldhamii</i>	30	26	86.7	23 (76.7)	3 (10.0)	0 (0)
<i>V. smallii</i>	90	82	91.1	44 (48.9)	33 (36.7)	5 (5.6)
<i>V. vitis-idaea</i>	20	16	80.0	0 (0)	8 (40.0)	8 (40.0)
<i>V. uliginosum</i> ^z	90	90	100	[21] (23.3)	[17] (18.9)	[52] (57.8)

Explants were treated with oryzalin treatment. Then explants were cultured on MW medium.

Two month after culture, survival rate of explants were determined and new shoot from axillary bud were analyzed using flow cytometry.

^z*V. uliginosum* is octoploid (2n = 6x = 72).

^y(No. of explants survived / No. of explants treated) × 100.

数性キメラ（二倍体と四倍体）誘導率が 36.7%であり，倍数性キメラの方が多かった．コケモモでは，四倍体と倍数性キメラ（二倍体と四倍体）の誘導率がいずれも 40.0%となった．クロマメノキでは，57.8%という高率で十二倍体を得られた．順化した染色体倍加個体の根端の染色体数を調査したところ，FCMで四倍体と推定されたスノキ（Fig. 12）とコケモモは 48本の染色体を有する四倍体であることが確認されたが，クロマメノキは正確な染色体数を確認するには至らなかった．ナツハゼは，四倍体を得られず倍数性キメラ（二倍体と四倍体）の誘導率も 10%であったが，順化後に完全な染色体倍加個体を分離し，ラビットアイブルーベリー ‘Homebell’ 台木に接ぎ木し，順調な生育を示している（Fig. 11B）．

考察

スノキ属植物では，ラビットアイブルーベリー，ハイブッシュブルーベリーおよびそれらと野生種との交雑種などで，種子や多芽体由来のシュートを用いたコルヒチン処理による染色体倍加が試みられている（Dweikat・Lyrene, 1989; Goldy・Lyrene, 1984; Lyrene・Perry, 1982; Perry・Lyrene, 1984）．本章では，種子ではなく多芽体由来のシュートを供試材料としたスノキ属植物の染色体倍加法を確立した．今後，二倍体の日本産スノキ属植物と四倍体のハイブッシュブルーベリーとの交雑育種を進めるうえでは，前者の染色体倍加が必要と

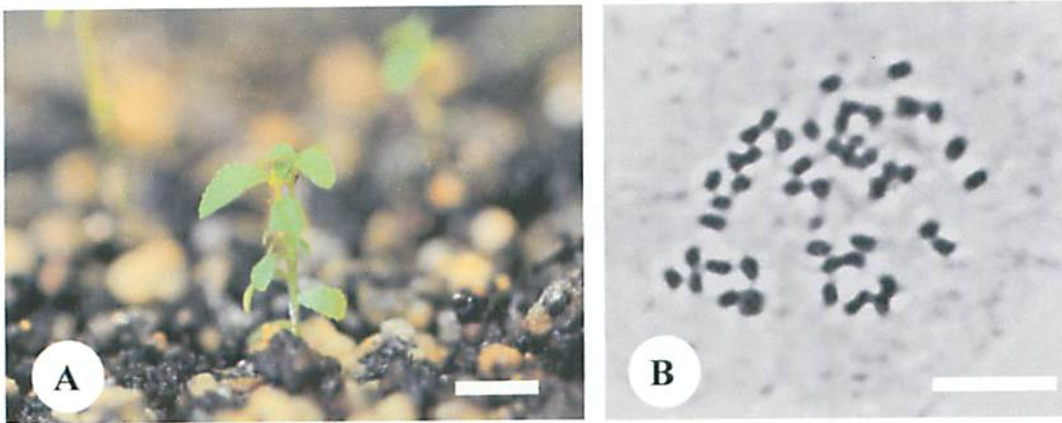


Fig. 12 Autopolyploid of *V. samalii* (A) and chromosome ($2n = 4x = 48$) (B).
Bars = 1 cm (A) and 10 μm (B).

なる。野生種は種内において遺伝子多様性を有するため、交雑には優良な遺伝子型を選抜することが重要である。実生は遺伝形質が不均一であるが、選抜した優良な遺伝子型をもつ系統の多芽体由来シュートから染色体倍加個体を獲得することで、育種目標にかなう雑種の育成につながると考えられる。これまでに行われたスノキ属植物におけるコルヒチン処理濃度は 0～0.2%，処理時間は 6 時間～8 週間と多様である。Lyrene・Perry（1982）は、コルヒチン処理したシュートでは生存率の減少と生育の抑制が認められ、処理後にコルヒチン無添加培地で培養したシュートの中には、伸長開始まで数か月を要したことを報告している。また、Perry・Lyrene（1984）は、コルヒチンを処理した 3 種すべてで、コルヒチン濃度の上昇と処理時間の延長によりシュートの生存率が減少する傾向が認められたが、一部では処理時間と生存率に関連性がなかったと報告している。本章においても、コルヒチン処理濃度と時間が生存率に及ぼす影響には、一定の傾向が認められなかった。これらのことから、スノキ属植物のコルヒチンへの反応は、処理条件、遺伝子型および供試部位などにより異なるものと推察された。

オリザリン処理では、処理時間の延長（Allumら，2007；Dunn・Lindstrom，2007；Kermaniら，2003）と濃度の上昇（van Durenら，1996）により、供試材料の生存率が減少することが報告されている。本章においても、オリザリン処理した‘Berkeley’の生存率は、処理濃度の上昇と処理時間の延長により減少した。特に、0.005%・48 時間では 3.3%の生存率を示し、

同条件のコルヒチン処理の生存率（56.7%）と比較すると低い値となった。以上のことから、スノキ属植物におけるオリザリン処理は、コルヒチンと同様に処理濃度の上昇または処理時間の延長によりシュートの生存率を低下させ、特に、長時間の処理は植物体へ悪影響を及ぼすものと思われた。

Goldy・Lyrene（1984）は、コルヒチンを添加した液体培地にハイブッシュブルーベリーのシュートを浸漬処理した結果、0.025%で24～48時間処理することにより染色体倍加個体を獲得している。Perry・Lyrene（1984）は、*V. elliotii*のシュートに0.01%コルヒチンを2週間処理することにより染色体倍加個体を獲得したが、コルヒチンへの反応は遺伝子型により異なると報告している。Dweikat・Lyrene（1989）は、ハイブッシュブルーベリーと*V. elliotii*の三倍体種間雑種FL 81-19のシュートを、0.02%コルヒチン添加培地で6日間培養することにより、最も高い頻度で染色体倍加個体を獲得している。しかしながら、これらの報告では、染色体倍加個体の誘導率には全く言及されていない。本章では、‘Berkeley’において濃度と時間を組み合わせた20のコルヒチン処理区のうち、10処理区で染色体倍加個体が得られ、このうち0.005%の96時間処理区では、13.3%の染色体倍加個体誘導率を示した。

van Durenら（1996）は、バナナのシュートにコルヒチンとオリザリンを処理し、コルヒチン処理（0.2%・48時間）の染色体倍加個体誘導率が最高23.1%であったのに対し、オリザリン処理（0.01%・7日間）のそれは最高29.1%を示し、オリザリン処理において染色体倍加個体誘導率が高かったとして

いる。リンゴ (Bouvier ら, 1994) やキウイフルーツ (Chalak・Legave, 1996) でも, コルヒチン処理に比べてオリザリン処理で四倍体の誘導率が高いことが報告されている。本章においても, 'Berkeley' のオリザリン処理による染色体倍加個体誘導率の最高は 23.3% (0.005%・24 時間) であり, コルヒチン処理 (13.3%) よりも高い値を示した。日本産スノキ属植物 3 種においても, 5.6~57.8% の割合で染色体倍加個体を獲得し, 倍数性キメラ個体から分離した染色体倍加個体を含めると, オリザリン処理により, 日本産スノキ属植物すべての染色体倍加個体を獲得することに成功した。

以上の結果, スノキ属植物の染色体倍加に及ぼすオリザリン処理の有効性が明らかとなった。本章で得られた染色体倍加個体は, ラビットアイブルーベリー台木に接ぎ木した後, 順調な生育を示しているが, 現在のところ開花に至っていない。カンキツにおいては, コルヒチン処理によって得られた染色体倍加個体は, 完全にすべての細胞が倍加していない場合, 育成中に元の倍数体に戻ることや周縁キメラになることが報告されていることから (古田ら, 2004; 糠谷ら, 2011; Yahata ら, 2005b), 今後は, 生育特性や生殖稔性を調査するとともに, 染色体倍加した日本産スノキ属植物の倍数性の再解析を行う必要があると考えられる。

摘要

日本産スノキ属植物とブルーベリー栽培品種において、多芽体由来シュートを用いた染色体倍加を検討した。コルヒチンとオリザリンを様々な濃度や時間でシュートに処理し、その後 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ zeatin を添加した MW 培地で培養した。培養したシュートの腋芽から新たに発生したシュートの倍数性を解析した。染色体倍加個体の誘導率は有糸分裂阻害物質の種類、処理濃度、処理時間および供試した種により異なったが、本処理条件内では、オリザリンの方がコルヒチンより高い値を示した。特に、 $0.005\% \cdot 24$ 時間でオリザリン処理を行った場合、北部ハイブッシュブルーベリー 'Berkeley'、スノキ、コケモモおよびクロマメノキにおいて 23.3、5.6、40.0 および 57.8% の染色体倍加個体を得られた。これらの染色体倍加個体は、ラビットアイブルーベリー 'Homebell' 台木に接ぎ木した後、順調な生育を示している。以上のように、多芽体由来シュートへのオリザリン処理により、スノキ属植物の染色体倍加個体を効率的に誘導できることが明らかになった。

第 3 章

スノキ属植物における種間交雑

緒言

日本には 19 種のスノキ属植物が北海道から沖縄県まで広範囲に分布している (山崎, 1989). 第 1 章では, これらのうちナツハゼとシャシャンボの果実が高い機能性を有することを明らかにした. 常緑性低木のシャシャンボ (*Bracteata* 節) ($2n=2x=24$) は 関東地方南部から沖縄県に自生し, 果実は食用に供される (Atkinson ら, 1995; Hirai ら, 2010; Iwagaki ら, 1977). 同種は 5 月~6 月に開花し, 10 月~12 月に成熟して暗青色の果実を着生する. 本種は, 根域が広く耐乾性を有しており, ブルーベリーと比較して高い土壌 pH にも適応するため (刈住, 1979; Luby ら, 1991), 國武ら (2006) はブルーベリーの台木として利用できると報告している. 一方で, 栽培種のハイブッシュブルーベリー (*Cyanococcus* 節) ($2n=4x=48$) の生育には酸性土壌が不可欠であり, また, 根域が浅く根毛のない繊維根であるため, 常に地表下 1 m 程度の範囲における湿度を維持する必要がある (Lyrene, 2011). そのため, シャシャンボは高い機能性を有し, 土壌適応性を含めた環境適応性の高いハイブッシュブルーベリーを育成するための遺伝資源として利用できるものと思われるが, これまでにブルーベリーとシャシャンボの種間交雑は行われてい

ない。

スノキ属植物においては，節間交雑による雑種獲得例がいくつか報告されている (Ballington, 1980, 2001; Darrow・Camp, 1945; Lyrene, 2011; Rousi, 1963)。しかしながら，これまでに著者が行った二倍体シャシャンボと四倍体ハイブッシュブルーベリーとの節間交雑では雑種獲得に至っていない (津田, 2007)。この交雑失敗の要因は，スノキ属における強いトリプロイドブロックに加え (Darrow ら, 1944)，*Bracteata* 節と *Cyanococcus* 節の間における他の遺伝的な交雑障壁が関与しているものと思われる。ブルーベリー育種家が *Cyanococcus* 節の種と他節の種を交雑する場合，節間における遺伝的障壁に加えて，異倍数体間交雑に伴う障壁が加わるのを防ぐために，主として倍数性の同じ種が用いられてきた (Lyrene・Ballington, 1986)。ブルーベリーにおいては，倍数性が異なることに起因する交雑障壁を打破するために， $2n$ 配偶子を多く生産する個体やコルヒチンにより誘導された染色体倍加個体が利用されてきた (Lyrene, 2011)。第二章で獲得した日本産スノキ属植物の染色体倍加個体は現在までに開花に至っていないが，著者は，これまでに二倍体シャシャンボ種子へのコルヒチン処理により四倍体シャシャンボを数個体獲得しており (津田, 2007)，これらの個体をハイブッシュブルーベリーとの交雑に用いることで異倍数体間における交雑障壁を打破できるものと思われる。

本章の目的は，第 1 に染色体倍加した四倍体シャシャンボとハイブッシュブルーベリー ‘Spartan’ の交雑により節間雑

種を育成することである。第 2 に，節間交雑により育成した推定雑種の雑種特性と倍数性を，形態調査，DNA マーカー，フローサイトメトリーおよび染色体観察により調査することである。最後に，節間雑種における生育相，形態的特徴，花粉染色稔性および果実品質を明らかにすることである。

材料および方法

1. 植物材料および交雑試験

2002 年に福岡県八女市で採取した二倍体シャシャンボの今村 6 号および今村 9 号の放任受粉由来の果実から種子を採取し，有効塩素 2% の次亜塩素酸ナトリウムで 7 分間殺菌し，水洗後に 0.05% コルヒチン，2% スクロースおよび 0.8% 寒天を添加した MW 培地（pH4.8）に置床し，25°C，24 時間連続照明下（ $38 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ）で培養した。培養 20 日後に，種子をコルヒチン無添加の同培地に継代し，成長を促進した。発芽した種子は順化 6 か月後および 4 年後に形態観察，フローサイトメトリーおよび染色体観察による倍数性調査を行い，四倍体シャシャンボ（VB4x-1 と VB4x-2）を選抜し，宮崎大学農学部木花フィールド温室にて育成した（津田，2007）。

2009 年 6 月上旬に，宮崎大学農学部木花フィールド圃場にて VB4x-1（89 花）と VB4x-2（14 花）に四倍体ハイブッシュブルーベリー ‘Spartan’ の花粉を人工受粉した。‘Spartan’ は，果実が大きく食味良好で日本における果実品質の評価が高いため花粉親として供試した。花粉は開花直前の蕾を採取

し、葯を取り出して一昼夜乾燥させた後、 -20°C で保存したものを供試した。人工受粉では、乾燥した葯をカミソリで刻んで花粉を取り出した後、綿棒の先端に花粉を付着させ、開花直後の柱頭に受粉させた。なお、ブルーベリー育種においては、通常、除雄により種子親の花弁、葯および花糸を取り除くが、本試験においてはいずれの組織も取り除かずに、花冠の開口部位から受粉した。2009年10月10日から12月13日までの成熟期に採取した果実から種子を取り出し、直ちに湿ったピートモス上に播種し室温で管理した。また、対照として落葉性のラビットアイブルーベリー‘T100’の放任受粉由来の実生を同様に播種し育成した。発芽した実生は2010年3月にピートモスとボラ土の等量混合用土を充填した6 cm ポリポットに鉢上げして屋外で順化し、2010年6月に前期と同じ用土を充填した12 cm ポリポットに植え替えた。発芽から2010年12月までの観察結果を元に選抜した推定雑種実生5個体(JM1~5)を2011年1月にラビットアイブルーベリー‘Homebell’に接ぎ木し生育を促進させた。交雑により得られた全ての実生、接ぎ木した推定雑種および両親の各個体は、宮崎大学農学部木花フィールド温室内で育成し実験に供試した。推定雑種の生育相調査、形態調査、雑種性と倍数性の解析および果実の品質調査には、同温室内で育成中のJM1, 2, 3, 4, 5および‘Spartan’の接ぎ木樹およびVB4x-1とVB4x-2の自根樹を供試した。なお、JM1, 2, 3およびJM4の種子親はVB4x-1であるがJM5のみ種子親がVB4x-2である。

次に、シャシャンボとブルーベリーの交雑における除雄お

よび混合受粉の影響を調査した。ブルーベリーの花粉管伸長は低温により阻害され、通常、花粉管が胚珠に達するのに1～4日を要するため(Eck, 1988)、ガラス温室内において晴天の午前中に受粉を行い、受粉日を含めて3日以上晴天が続く日を選択した。材料には、VB4x-1と‘Spartan’を供試した。2013年5月下旬から6月上旬に、‘Spartan’の花粉をVB4x-1に受粉して袋をかけ、受粉96時間後に花を採取し、FAA(70%エタノール：酢酸：ホルムアルデヒド=90：5：5)で固定した。試験区は、有除雄と無除雄の2区および他家受粉(‘Spartan’花粉)、自家受粉(VB4x-1花粉)および混合受粉(‘Spartan’花粉とVB4x-1花粉混合)の3区を組み合わせた6区とした。また、VB4x-1の花に受粉をせずに袋かけのみをしたものを対照区とした。混合受粉区は、‘Spartan’とVB4x-1の蒴をそれぞれ50個と100個同時にカミソリで刻んだ後、混合した花粉を用いた。固定した花を水洗後、Martin(1958)の方法に従い、0.1M K_3PO_4 に溶解した0.1%アニリンブルーに5°Cで一昼夜浸漬・染色し、落射蛍光顕微鏡(BX51, Olympus, Tokyo, Japan)を用いてUV励起で花粉管伸長を観察した。さらに、同様の組み合わせで交配した果実を成熟直前に採取し、着果数、着果率、完全種子数および不完全種子数を調査した。

2. 生育相および形態調査

生育相調査では、2012年に開花期、成熟期および落葉期を調査した。形態調査は、葉、花、花粉および果実について行った。すなわち、葉については、2011年10月上旬に葉身長、

葉幅，葉身形指数および単位面積当たりの葉重の4項目を調査した。また，シャシャンボに特有である葉裏面の中肋上突起の有無を確認した。さらに，‘Spartan’の紅葉最盛期（最も葉色が鮮やかな時期）である2011年12月下旬に色差計（NF333, Nippon Denshoku, Tokyo, Japan）を用いて葉表面の色を測定した。推定雑種（JM1, 3, 4および5）は接ぎ木2年後に開花した。花については，2012年4-5月に花冠長，花冠幅，花形指数，開口部径，花柄長，花柱長および一花房当たりの花数の7項目について調査した。果実については，2013年の成熟期に果実重，果実の縦径と横径，果形指数の4項目，2012年に可溶性固形物含量，完全種子数，不完全種子数および果皮色の5項目について調査した。また，果実の成長曲線を明らかにするため，2013年に満開2週間後から成熟まで1週間ごとに果実の横径を調査した。形態調査には最低10個の葉，花および果実を供試した。さらに，果実調査用の花にはハイブッシュブルーベリー‘Berkeley’の花粉を除雄せずに人工受粉し，肥大した果実を果実調査に供試した。

3.分子マーカーによる解析

Random amplified polymorphic DNA（RAPD）と Cleaved amplified polymorphic sequence（CAPS）分析のための全DNAは，各供試植物の幼葉から一部修正を加えた Cetyltrimethylammonium bromide（CTAB）法（Doyle・Doyle, 1987）により抽出した。RAPD分析は Williamsら（1990）の手法を適用し，40種類の Operon random 10-mer primers（OPA1

~20 と OPH1~20) (Operon Technologies, Alameda, CA, USA) を用いた。Polymerase chain reaction (PCR) の 25 μ L 反応液の組成は、2.0 μ L 10 \times Ex Taq buffer, 1.6 μ L dNTPs, 0.5 μ L random primer, 0.1 μ L 5units *Ex Taq* (Takara Bio Inc., Shiga, Japan), 0.1 μ L 鋳型 DNA および 15.7 μ L 滅菌水とした。DNA の増幅には、My CyclorTM Thermal Cyclor (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用い、反応条件は、前処理 95 $^{\circ}$ C \cdot 2 分間、熱変性 95 $^{\circ}$ C \cdot 1 分間、アニーリング 35 $^{\circ}$ C \cdot 3 分間、伸長反応 72 $^{\circ}$ C \cdot 2 分間の 45 サイクルとし、最後に 72 $^{\circ}$ C で 5 分間の伸長反応を行った。その後、増幅産物を 0.1 μ g \cdot mL⁻¹ ethidium bromide (IBI Scientific, Peosta, IA, USA) を含む 1.0% アガロースゲルで電気泳動し、紫外線照射下 (360 nm) でバンドパターンを観察した。それぞれのプライマーにおいて最低 2 回以上の PCR を行い、安定した多型のみを解析に用いた。

CAPS 分析は、いくつかの葉緑体 (cp) DNA とミトコンドリア (mt) DNA の非コード領域について行った。cpDNA は、trnK-3914F-trnK-2R の領域について、Cheng ら (2002) と Ureshino \cdot Miyajima (2002) の手法に従って行った。反応液の組成は、2.0 μ L 10 \times Ex Taq buffer, 1.6 μ L dNTPs, 0.5 μ L primer 1, 0.5 μ L primer 2, 0.1 μ L 5units *Ex Taq* (Takara Bio Inc., Shiga, Japan), 0.1 μ L 鋳型 DNA および 15.2 μ L 滅菌水の全 20 μ L とした。DNA 増幅には、全 DNA 解析と同様の機種を使用した。PCR 反応条件は前処理 94 $^{\circ}$ C \cdot 3 分間、熱変性 94 $^{\circ}$ C \cdot 1 分、アニーリング 55 $^{\circ}$ C \cdot 1 分、伸長反応 72 $^{\circ}$ C \cdot 3 分 30 秒間の 35 サ

イクルとした。本領域の増幅断片を用い、制限酵素処理を行った。制限酵素は、Bam H I , EcoR I , EcoR V , Hinf I , Kpn I , Mbo I , Msp I , Mun I , Nco I , Not I , Pvu II , Sac I , Sac II , Sal I , Sma I , Sph I , Taq I , Xba I および Xho I の 19 種類を使用し、切断後、 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ethidium bromide を含む 0.7% アガロースゲルで電気泳動を行い、紫外線照射下 (360 nm) で断片長の多型を観察した。なお、いずれも制限酵素の反応条件は、 37°C で 15 時間以上とした。

mtDNA は、*18SrRNA-5SrRNA* と *nad4exon1-nad4exon2* の領域について、Cheng ら (2002) と Dumolin-Lapegue ら (1997) の手法に従って行った。反応液の組成は cpDNA 解析の trnK-3914F-trnK-2R で使用したものの同様とし、PCR 反応には全 DNA 解析および cpDNA 解析で用いた機種を使用した。PCR 反応条件はどちらも前処理 $94^{\circ}\text{C} \cdot 4$ 分間行い、熱変性 $94^{\circ}\text{C} \cdot 1$ 分間、アニーリング $60^{\circ}\text{C} \cdot 1$ 分間、伸長反応 $72^{\circ}\text{C} \cdot 2$ 分間を 30 サイクル繰り返した。得られた増幅断片を用いて、制限酵素 Bam H I , BsrG I , EcoR I , EcoR V , Hae III , Hinf I , Kpn I , Ksp I , Mbo I , Msp I , Mun I , Nco I , Not I , Pvu II , Sac I , Sac II , Sal I , Sma I , Spe I , Sph I , Xba I および Xho I の 22 種類を使用し、切断後、 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ethidium bromide を含む 0.7% アガロースゲルで電気泳動を行い、紫外線照射下 (360 nm) で断片長の多型を観察した。いずれも制限酵素の反応条件は、 37°C で 15 時間以上とした。

4. 倍数性調査

推定雑種の倍数性を確認するために、フローサイトメーターによる方法と酵素解離による染色体観察法を適用した。フローサイトメーターによる方法では Cell Lab Quanta™ SC MPL System (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA) を用い、第二章と同じ方法で試料を調整し、試料と内部標準のタヒチライム (*Citrus* 'Tahiti Lime': 1.17 pg/2C) (Ollitrault ら, 1994) の相対蛍光強度を比較することにより核 DNA 含量を算出した。なお、測定は 3 反復行った。また、染色体の観察も第二章と同様の方法で行い、供試材料として推定雑種と両親の茎頂 (3~5 mm) を用いた。

5.花粉染色稔性および形態調査

開花直前の蕾から葯を取り出し、25°C・24 時間乾燥後、花粉の調査まで -40°C で保存した。花粉染色稔性調査においては、スライドガラスに酢酸カーミン溶液 (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) を滴下し、2~3 花から集めた 4~6 個の葯を同溶液中でピンセットを用いてつぶして花粉を抽出し検鏡した。花粉染色稔性は、光学顕微鏡 (BX51, Olympus, Tokyo, Japan) 下で 1 反復当たり最低 200 個の花粉を観察し、供試花粉に対する完全に染色された花粉の割合を求めた。なお、試験は 3 反復で行った。

6.果実の成分分析

成熟期に 'Spartan', 推定雑種 (JM1, JM4 および JM5) およびシャシャンボの果実を採取し -40°C で凍結後に粉碎機

(CQ-35R, Toshiba, Kawasaki, Japan) で摩砕・混合し凍結乾燥機 (DRC-1000 および FDU-2100, EYELA, Tokyo, Japan) を用いて凍結乾燥粉末化した後, 分析まで -30°C で保存した. なお, 推定雑種の種子親である四倍体シャシャンボは結実不良で分析に供試できなかつたため, 対照として VB2x-1 (二倍体シャシャンボ) の果実を用いた. 総ポリフェノール含量と抗酸化能測定には 2012 年に収穫した果実を供試した. また, アントシアニン含量の分析のみ 2013 年に採取した果実を用い, 'Spartan', JM1 および JM5 は果肉と果皮を個別に分析した. 果実の成分分析は第 1 章と同様の方法により抽出と分析を 3 回行い, Tukey の多重検定により統計処理を行った. ただし, アントシアニン含量のみ新鮮重 1 g 当たりの Cyanidin 3-glucoside 相当量で算出した.

結果

コルヒチン処理により誘導した四倍体シャシャンボ 2 系統にハイブッシュブルーベリー 'Spartan' を交配した結果, 34 果が結実し (VB4x-1: 29 果実, VB4x-2: 5 果実), 104 個の完全種子を得た (VB4x-1: 81 個, VB4x-2: 23 個). また, それらの種子から 66 個体の実生を獲得した (Table 5). 鉢上げした実生を屋外で低温に遭遇させたところ, 5 個体は茎葉が暗赤色に変化した (Fig. 13A-D), 残りの 61 個体の茎葉は緑色を維持していた (Fig. 13E). また, 対照区として育成した落葉性のラビットアイブルーベリーの实生の茎葉は, 前者の 5 個

Table 5 Fruit sets, seed contents and number of seedlings in the crosses between the tetraploid shashanbo and highbush blueberry 'Spartan'.

Cross combination ²	No. of flower	No. of	% of	No. of	No. of seedling obtained ³		
Seed parents	Pollen parent	pollinated	fruit set	developed seed	Deciduous type	Ever green type	
VB4x-1	'Spartan'	89	29	32.6	81	4	39
VB4x-2	'Spartan'	14	5	35.7	23	1	22

²These cross was conducted without emasculation.

³Deciduous type: The leaf and stem color of these seedlings were changed from green to dark red with low temperature similarly to deciduous rabbiteye blueberry 'T100'.
Evergreen type: This type kept leaf and stem color with green.

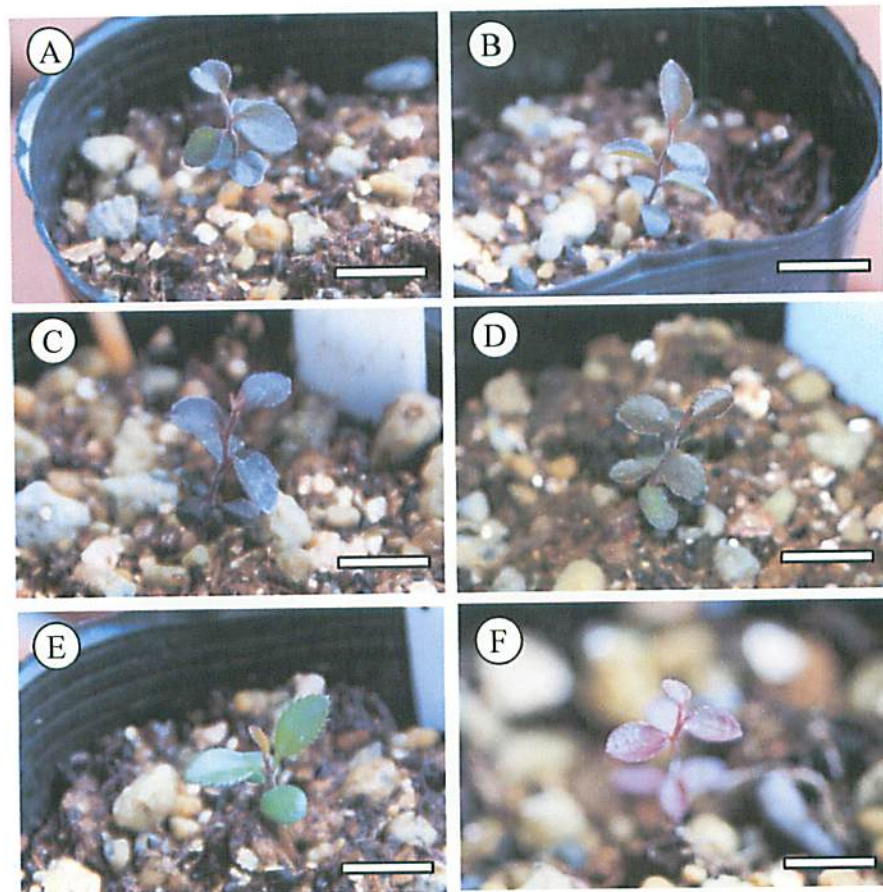


Fig. 13 Selection of deciduous lines from putative intersectional hybrid seedlings. A: JM1, B: JM2, C: JM3, D: JM5, E: JM6, (A-E: putative hybrids), F: 'T100' (rabbieye blueberry). A-D: Deciduous type (The leaf and stem color of these seedlings were changed from green to dark red with low temperature similarly to deciduous rabbieye blueberry 'T100'), E: Evergreen type (This type kept leaf and stem color with green). Bars = 10 mm.

体と同様に暗赤色を呈した (Fig. 13F). このことから, 落葉性のラビットアイブルーベリーと同様の茎葉色変化を呈した前者の個体を落葉タイプ, 茎葉が緑色を維持していた後者の個体を常緑タイプとして分類した. これらの推定雑種実生のほとんどは樹勢が強く, 播種 1 年後には樹高 30 cm 程度に達した. 特に, 落葉タイプの実生は常緑タイプと比較して総じて生育が早い傾向が認められた.

次に, VB4x-1 と 'Spartan' の交雑における除雄および混合受粉の影響を調査した (Table 6). 全ての処理区で除雄により着果率と完全種子数が減少した. また, 除雄の有無に関わらず, 混合受粉が最も高い着果率を示した. さらに, 有除雄区で正常の大きさまで肥大する果実がなかったのに対し, 無除雄区では, 果実が正常な大きさまでに肥大しなくても完全種子を有するものが認められた (データ未掲載). 次に, 花粉管伸長に及ぼす除雄の影響を調査した結果, 全区において除雄により花粉管伸長が抑制された. 他家受粉, 混合受粉および自家受粉において, 花粉管が花柱基部に達した花柱の割合を調査した結果, 無除雄区では, それぞれ 100, 80.0 および 81.8% であったのに対し, 有除雄区ではそれぞれ 27.3, 40.0 および 9.1% を示した (Fig. 14). また, 無除雄区ではいずれの受粉においても, 花柱基部で多数の花粉管が確認されたのに対し (Fig. 15A, C, E), 有除雄区では花柱基部においてほとんど花粉管が確認されなかった (Fig. 15B, D, F). さらに, 無除雄の他家受粉区では, 柱頭上で多数の花粉管の発芽が認められ (Fig. 16A), 花柱上部 (Fig. 16B), 中部 (Fig. 16C), 基部

Table 6 The effects of emasculation and mixed pollination on fruit set and seed development in the crosses between tetraploid shashanbo VB4x-1 and highbush blueberry 'Spartan'

Cross combination		Emasculation ^y	No. of flowers pollinated	No. of fruits set	% of fruit set	Seeds (no.)	
Seed parents	Pollen parents					Developed	Undeveloped
<i>Cross pollination</i>							
VB4x-1	'Spartan'	+	20	7	35.0	0	13
		-	24	10	41.7	22	51
<i>Mixed pollination</i> ^z							
VB4x-1	'Spartan'	+	17	8	47.1	1	16
	+ VB4x-1	-	19	9	47.4	5	22
<i>Self pollination</i>							
VB4x-1	VB4x-1	+	16	3	18.8	0	3
		-	19	7	36.8	6	11
		No pollination	26	7	26.9	7	5

^zThe anther of 'Spartan' (50 anthers) and VB4x-1 (100 anthers) were mixed and chopped with laser blade. Then mixed pollen was used as mixed pollen.

^y+ = emasculation ; - = without emasculation ; No pollination = without pollination and bagged.

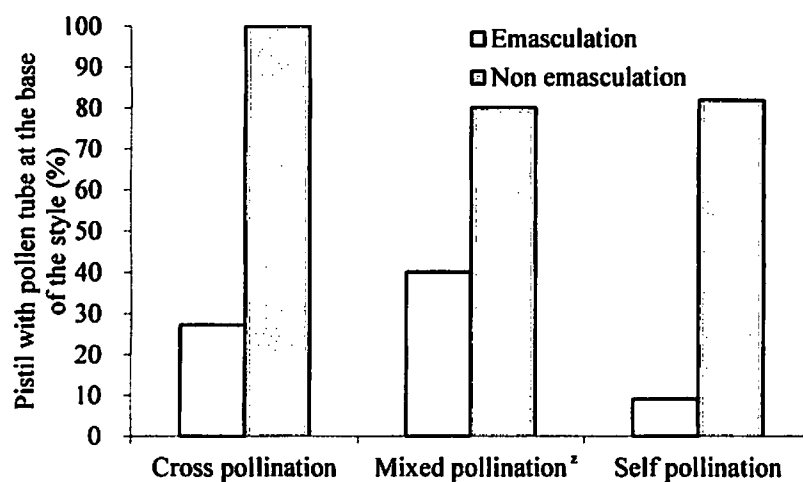


Fig. 14 The effects of emasculation and mixed pollination for pollen tube growth in the crosses between tetraploid shahsanbo VB4x-1 and highbush blueberry 'Spartan'. ^zThe anther of 'Spartan' (50 anthers) and VB4x-1 (100 anthers) were mixed and chopped with laser blade. Then mixed pollen was used for mixed pollination.

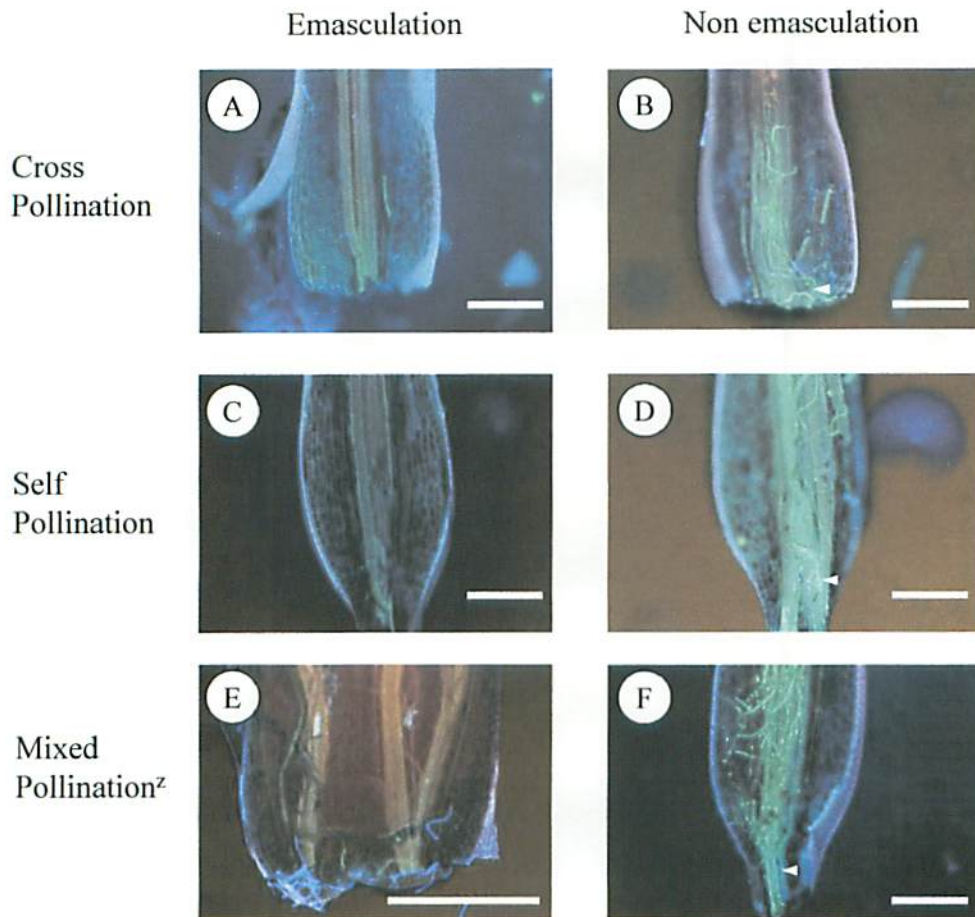


Fig. 15 Effects of emasculatation and mixed pollination on the pollen tube growth in the crosses between tetraploid shashanbo VB4x-1 and highbush blueberry 'Spartan'. ^zThe anther of 'Spartan' (50 anthers) and VB4x-1 (100 anthers) were mixed and chopped with laser blade. Then mixed pollen was used for mixed pollination. Arrow heads indicate pollen tubes. Bars = 500 μ m.

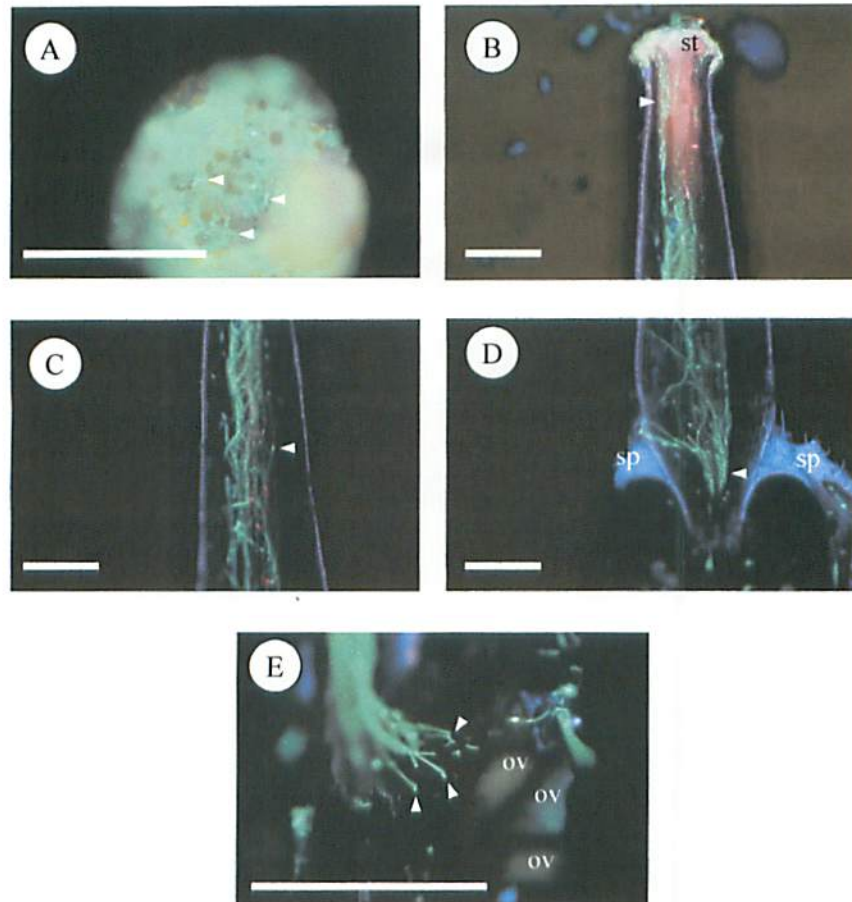


Fig. 16 Pollen tube growth in the crosses between tetraploid shashanbo VB4x-1 and highbush blueberry 'Spartan' without emasculation. A: stigma, B: upper part of style, C: middle part of style, D: base part of style, E: around the ovule. st: stigma, sp: sepal, ov: ovule. Arrow heads indicate pollen tubes. Bars = 500 μ m.

(Fig. 16D)において多くの花粉管の伸長が観察された。さらに、胚珠付近まで伸長した花粉管を多数確認することができた (Fig. 16E)。

落葉タイプの推定雑種 5 系統と両親の形態的特徴を比較した。全ての推定雑種は、樹勢が強く、シュートを多数伸長させたが、四倍体シャシャンボと推定雑種の新梢が赤味を帯びていたのに対し、'Spartan' の新梢は薄緑色を呈した。推定雑種における 2 年枝の樹皮は 'Spartan' と比較して滑らかであり、樹皮色と樹皮模様は四倍体シャシャンボと同様であった。推定雑種における葉の形態的特徴は、両親の一方に類似する項目と両親の中間の特徴を示す項目が認められた (Table 7, Fig. 17)。推定雑種の葉身長と葉幅は両親の中間の値を示したが、単位面積当たりの葉重 ($4.3 \sim 5.4 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-2}$) は VB4x-1 ($8.4 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-2}$) と VB4x-2 ($9.0 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-2}$) と比較して有意に小さい値を示した。また、'Spartan' の葉は全縁、四倍体シャシャンボの葉が明瞭な鋸歯を有するのに対し、推定雑種では鋸歯が認められるものの葉縁は VB4x と比較して滑らかであった。さらに、四倍体シャシャンボと推定雑種の葉裏面の中肋上には突起が認められたが、'Spartan' には同様の突起は認められなかった。次に、'Spartan' の葉が鮮赤色を示した紅葉最盛期に葉色を調査したところ、常緑性の四倍体シャシャンボが緑色を維持していたのに対し、推定雑種では系統間差異が認められ茶緑色～暗赤色を呈した。また、色差計による葉表面測定の結果、 a^* 値 (負の値が緑色、正の値が赤色を示す) は、'Spartan' (43.3)、推定雑種 (JM1: 17.3, JM2: 7.1, JM3:

Table 7 Comparison of the leaf characteristics in tetraploid shashanbo, highbush blueberry 'Spartan' and their putative hybrids.

Strains	Leaf blade (mm)		Leaf blade shape index (length/width)	Leaf wt (mg·cm ⁻²)	L*	Leaf color ^x	
	Length	Width				a*	b*
<i>shashanbo</i>							
VB4x-1	57.8 cd ^y	37.1 b	1.6 d	8.4 a	25.8 c	-12.8 e	14.6 bc
VB4x-2	43.6 e	28.7 d	1.5 d	9.0 a	34.6 ab	-17.5 e	27.0 a
<i>putative hybrids</i> ^z							
JM1	70.4 b	43.4 a	1.6 cd	4.3 f	28.4 bc	17.3 b	6.6 de
JM2	62.0 c	33.2 c	1.9 b	5.3 cde	30.8 ab	7.1 c	10.7 cd
JM3	74.1 b	32.9 c	2.3 a	5.3 b-e	24.2 c	9.7 c	3.2 e
JM4	54.8 d	31.7 cd	1.7 bc	4.8 ef	32.6 ab	-5.7 d	14.4 bc
JM5	55.1 d	30.4 d	1.8 b	5.4 b-e	31.6 ab	9.2 c	9.3 de
<i>highbush blueberry</i>							
'Spartan'	84.2 a	39.7 b	2.1 a	5.3 de	35.7 a	43.3 a	21.0 ab

^zSeed parents of JM1 to JM4 were VB4x-1, whereas VB4x-2 was used as a seed parent for JM5.

^yDifferent letters represent significant differences in Tukey's multiple range test, 1% level.

^xLeaf color was detected by spectrophotometer at the browning period of 'Spartan' (27. Dec. 2011).

(L*: lightness-darkness parameter, a*: red-green parameter, b*: blue-yellow parameter).

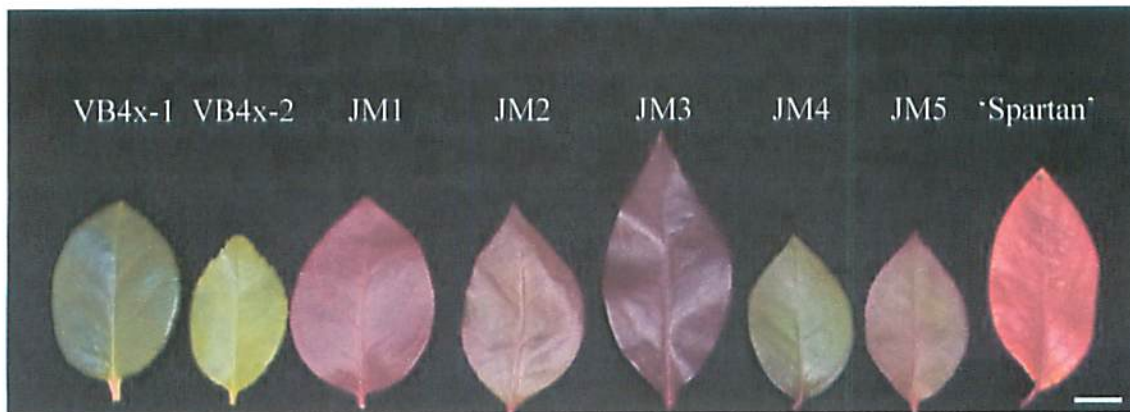


Fig. 17 Characteristics of leaves and leaf browning in tetraploid shashanbo, highbush blueberry 'Spartan' and their putative intersectional hybrids. VB4x-1, VB4x-2:tetraploid shashanbo; JM1, JM2, JM3, JM4, JM5: putative hybrids; 'Spartan': highbush blueberry. Leaf color was detected by spectrophotometer at the browning period of 'Spartan' (27 Dec. 2011). Bar = 20 mm.

9.7, JM4 : -5.7 および JM5 : 9.2) および四倍体シャシャンボ (VB4x-1 : -12.8, VB4x-2 : -17.5) の間で有意な差が認められ (Table 7), 肉眼による観察結果と一致した。さらに, 'Spartan' の葉は冬季に完全に落葉したが, 推定雑種においては, 冬季に葉色が赤色に変化したものの全ての葉が落葉せず, 春の時点においても一部の葉は着生していた。

VB4x-1 の開花が 5 月下旬に始まったのに対し, 'Spartan' の開花はじめは 4 月上旬であった (Fig. 18)。推定雑種は 4 月下旬または 5 月上旬に開花が始まり, 開花開始時期は両親の中間となった。花の形態調査を行った結果, 推定雑種の花冠は VB4x-1 と比較して有意に大きく, 大きさには系統間差異が認められた (Table 8, Fig. 19)。推定雑種の花柄長にも系統間差異が認められたものの, VB4x-1 と比較して有意に長いことが明らかとなった。また, VB4x-1 と推定雑種においては花弁, 花托および花柄に毛じが認められたが, 'Spartan' はいずれの組織にも毛じが観察されなかった。

'Spartan' の果実成熟は 6 月上旬に開始したのに対し, VB4x-1 の果実は 10 月中旬から成熟が始まった (Fig. 18)。推定雑種においては, 最も早い系統では 7 月上旬から成熟が始まり, 系統間差異が認められたものの果実収穫期間は 8 月下旬まで継続し, 両親の中間の成熟時期となった。また, 推定雑種の成熟期は, ラビットアイブルーベリーの極晩生品種とほぼ同時または少し遅くなった。果実の成長曲線を調査したところ (Fig. 20), 'Spartan' と推定雑種の果実肥大は二重 S 字曲線を示した。'Spartan' は満開 10 週後に果実が成熟した

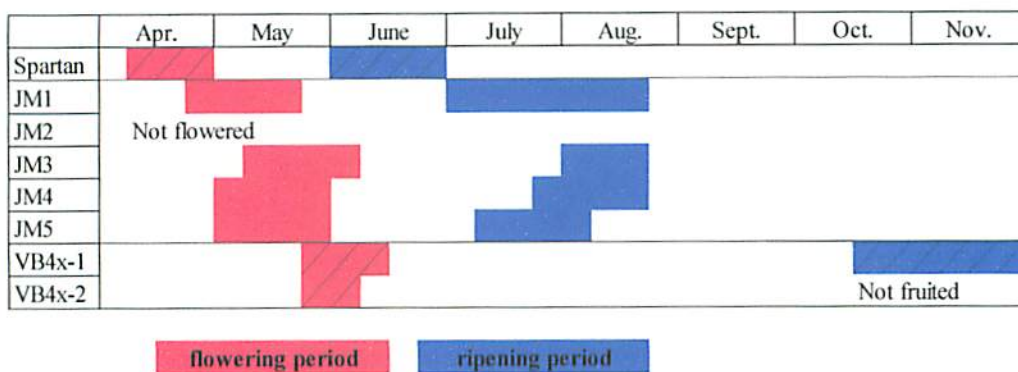


Fig. 18 Comparison of the flowering period and ripening period in tetraploid shashanbo, highbush blueberry 'Spartan' and their putative intersectional hybrids. VB4x-1, VB4x-2: tetraploid shshahnbo; JM1-5: putative hybrids.

Table 8 Comparison of the morphological characteristics of flowers in tetraploid shashanbo, highbush blueberry 'Spartan' and their putative hybrids.

Strains	Corolla (mm)		Corolla shape index (length/width)	Corolla aperture (mm)	Style length (mm)	Pedicel length (mm)	Florets (no.)
	Length	Width					
<i>shashanbo</i>							
VB4x-1	6.3 e ^y	5.2 e	1.2 ab	1.8 d	5.8 d	3.7 c	9.0 ab
VB4x-2	6.5 e	5.0 e	1.3 a	1.6 d	5.5 d	2.6 c	10.6 ab
<i>putative hybrids</i> ^z							
JM1	7.8 bc	9.4 b	0.8 d	4.6 a	7.3 c	7.4 b	11.4 ab
JM3	9.1 a	8.1 c	1.1 bc	3.2 b	10.1 a	15.7 a	10.7 ab
JM4	7.1 d	6.6 d	1.1 c	2.8 c	8.2 b	14.3 a	12.2 a
JM5	8.0 ab	6.7 d	1.2 b	2.6 c	8.5 b	7.6 b	12.0 a
<i>highbush blueberry</i>							
'Spartan'	7.4 cd	10.1 a	0.7 d	4.9 a	8.6 b	6.6 b	8.5 b

^zSeed parents of JM1, JM3 and JM4 were VB4x-1, whereas VB4x-2 was used as a seed parent for JM5.

^yDifferent letters represent significant differences in Tukey's multiple range test, 5% level.

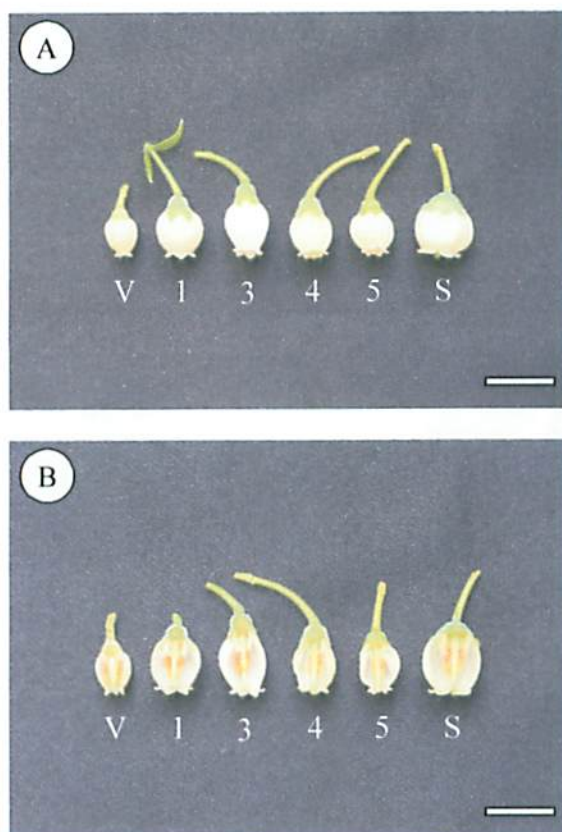


Fig. 19 Comparison of the morphological characteristics of flowers in tetraploid shashanbo VB4x-1, highbush blueberry 'Spartan' and their putative intersectional hybrids. V: tetraploid shashanbo VB4x-1; 1: JM1, 3: JM3, 4: JM4, 5: JM5 (putative intersectional hybrids); S: highbush blueberry 'Spartan'. A: whole flower. B: cross section. Bars = 10 mm.

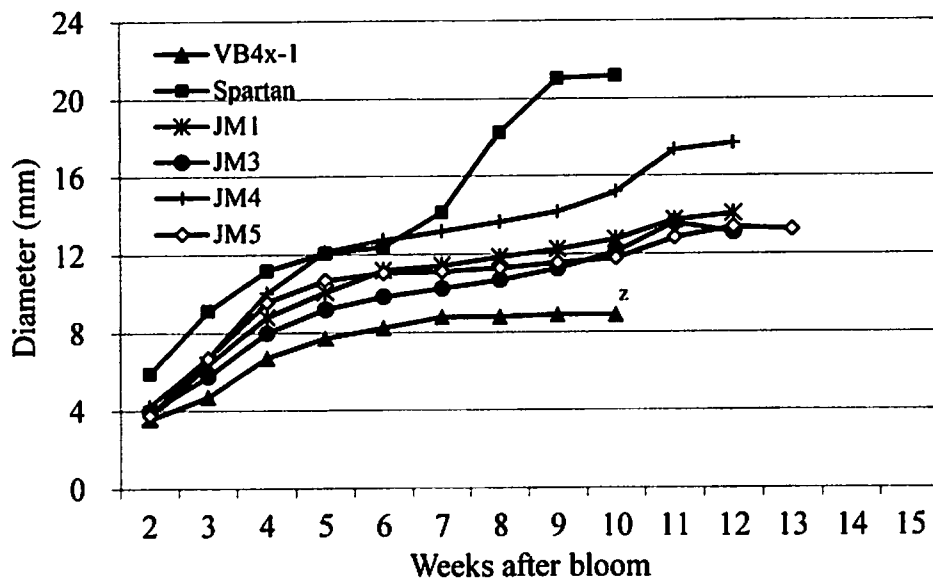


Fig. 20 Comparison of the fruit growth in tetraploid shashanbo VB4x-1, highbush blueberry 'Spartan' and their putative intersectional hybrids (JM1, 3, 4, 5). ^zThe fruit of VB4x-1 has not been investigated to maturity because of physiological fruit drop.

が、推定雑種は満開 12 または 13 週後に果実成熟に至った。一方、果実の成長曲線を調査した 2013 年においては、VB4x-1 の果実は満開 10 週後に全て生理落果し調査できなかった。次に、果実特性を調査結果 (Table 9, Fig. 21), 推定雑種の果実重 (1.3~2.5 g) は 'Spartan' (3.5 g) よりも軽く果実は小型であったものの、VB4x-1 (0.4 g) よりも大きい果実を着生した。JM4 (1.3) の果形指数は 'Spartan' (1.4) と有意差が認められず、VB4x-1 (1.1), JM1 (1.1), JM3 (1.1) および JM5 (1.2) と比較して扁平な果実を着生した。また、JM1 (15.8%) と JM4 (15.4%) の可溶性固形物含量は 'Spartan' (11.7%) と比較して有意に高い値を示した。また、全ての推定雑種において完全種子が得られ (Table 9), 採り播き後に全系統の発芽を確認した (データ未掲載)。次に、推定雑種における果皮色を調査したところ、明度 (L^*) は推定雑種と 'Spartan' の間に有意差が認められ、推定雑種は暗い果皮色を示した (Table 9)。注目すべきことに、推定雑種の果肉は VB4x-1 と同様に赤色を呈することが確認された (Fig. 22)。また、JM1 においては、同一個体において明確に区別可能な 2 種類の異なる形態を示す花序が確認された。花序は、大きな苞 (または小葉) を有するものと小さな苞 (または無苞) を持つものの 2 種類が認められ (Fig. 23), 前者は後者と比較して花序の出現期が遅い傾向が観察された。

RAPD 分析により推定雑種の雑種検定を行った。40 種類のプライマーを用いた結果、JM1, JM2, JM3, JM4 および JM5 において、それぞれ 6, 5, 4, 2 および 6 種類のプライマーに

Table 9 Comparison of the fruit characteristics in tetraploid shashanbo, highbush blueberry 'Spartan' and their putative hybrids.

Strains	Fruit wt (g)		Fruit size (mm)		Fruit shape index (diam/ht)	Soluble solids concn (%)	Seeds (no.)		Color of peel ^w											
	diam	ht	diam	ht			developed	undeveloped	L*	a*	b*									
<i>shashanbo</i> ^z																				
VB4x-1	0.4	e ^x	9.0	e	7.9	c	1.1	bc	17.2	a	2.7	bc	5.0	b	34.7	b	1.6	a	0.9	a
<i>putative hybrids</i> ^y																				
JM1	1.9	c	15.6	c	14.5	a	1.1	c	15.8	a	13.4	b	21.3	ab	25.9	c	0.0	b	-0.3	a
JM3	1.3	d	14.0	d	12.7	b	1.1	bc	9.5	b	8.0	bc	23.8	ab	26.1	c	0.4	ab	-0.7	a
JM4	2.5	b	18.0	b	14.4	a	1.3	ab	15.4	a	2.2	c	8.1	b	27.2	c	0.0	b	-0.8	a
JM5	1.4	cd	14.3	cd	12.2	b	1.2	b	13.1	ab	1.8	c	16.3	b	27.2	c	0.5	ab	-0.1	a
<i>highbush blueberry</i>																				
'Spartan'	3.5	a	20.2	a	14.9	a	1.4	a	11.7	b	27.8	a	40.3	a	46.7	a	0.3	b	-8.8	b

^zThe fruit of VB4x-2 has not been investigated because of poor fruit set.

^ySeed parents of JM1, JM3 and JM4 were VB4x-1, whereas VB4x-2 was used as a seed parent for JM5.

^xDifferent letters represent significant differences in Tukey's multiple range test, 1% level.

^wPeel color was detected by spectrophotometer at the harvest time (L*: lightness-darkness parameter, a*: red-green parameter, b*: blue-yellow parameter).

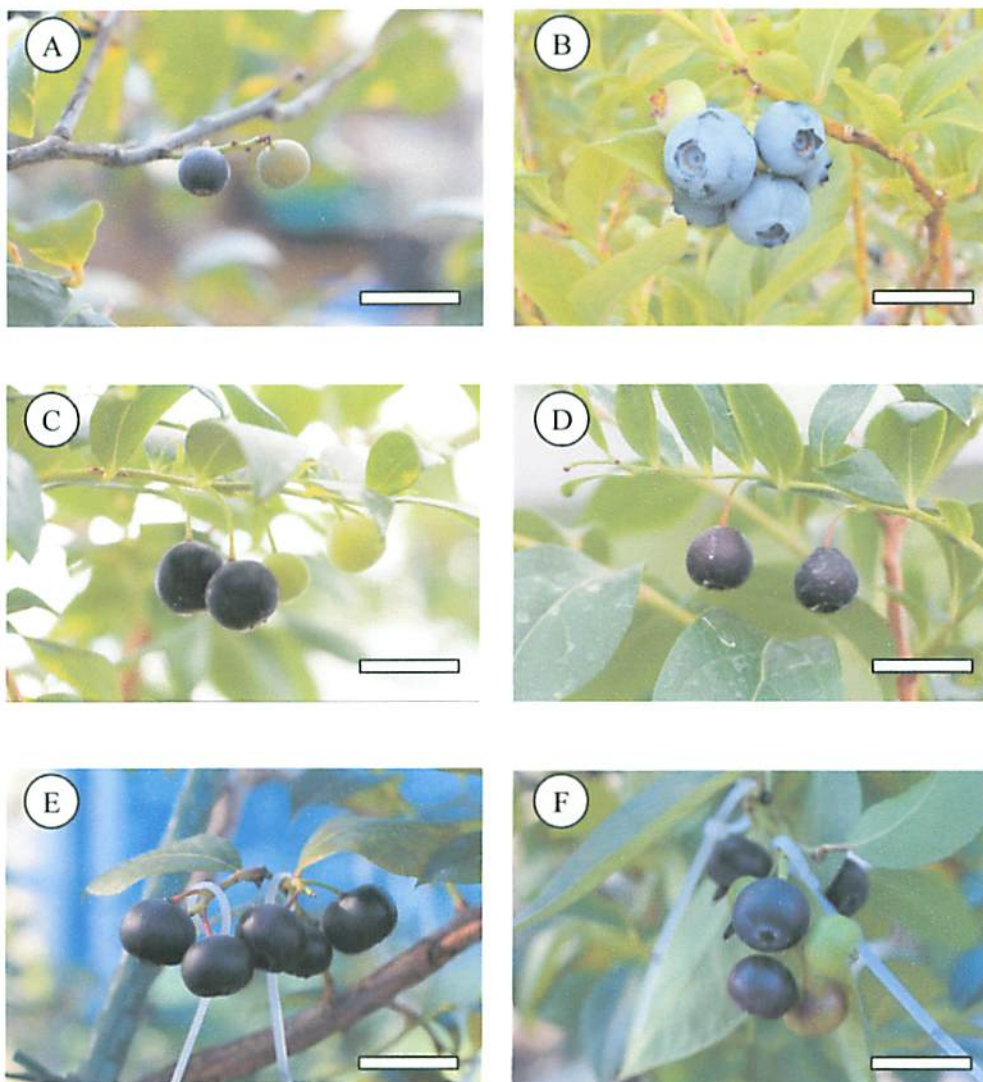


Fig. 21 Comparison of the morphological characteristics of fruits in tetraploid shashanbo VB4x-1, highbush blueberry 'Spartan' and their putative intersectional hybrids. A: tetraploid shashanbo VB4x-1, B: highbush blueberry 'Spartan', C-F: putative intersectional hybrids (C: JM1, D: JM3, E: JM4, F: JM5). Bars = 20 mm.

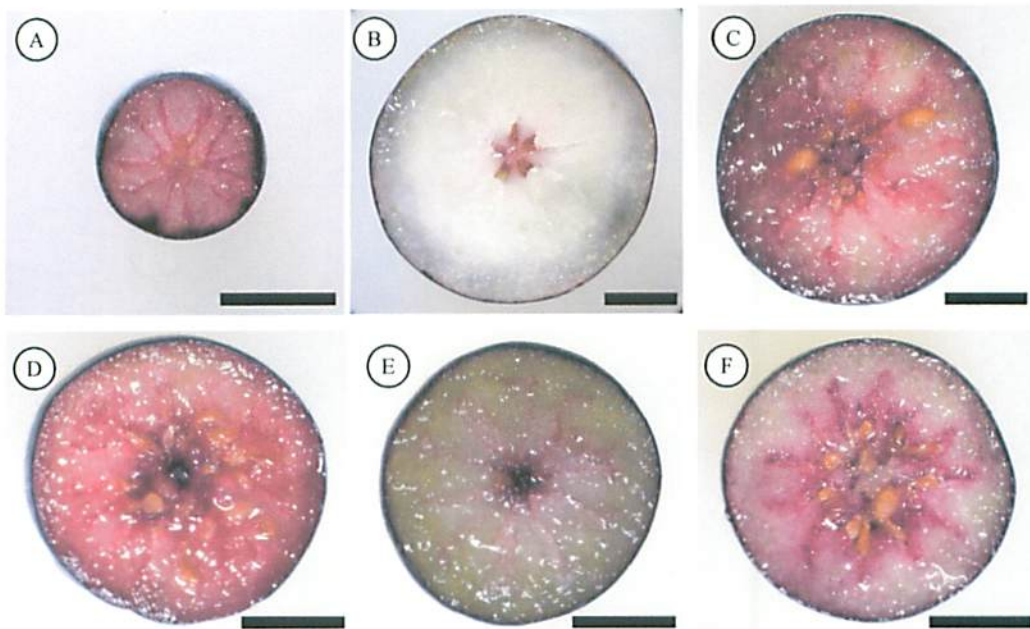


Fig. 22 Comparison of the cross section of fruit in tetraploid shashanbo VB4x-1, highbush blueberry 'Spartan' and their putative intersectional hybrids. A: tetraploid shashanbo VB4x-1, B: highbush blueberry 'Spartan', C-F: putative intersectional hybrids (C: JM1, D: JM3, E: JM4, F: JM5). Bars = 5 mm.

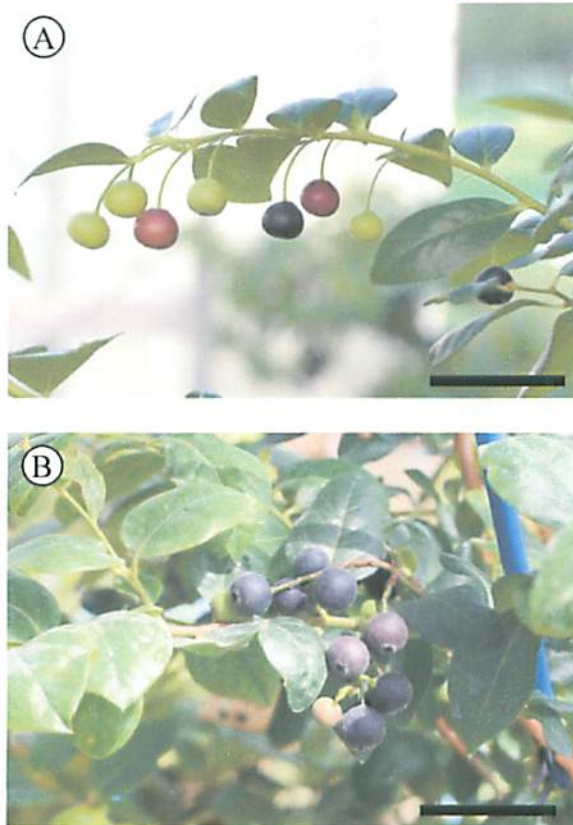


Fig. 23 Maturing fruit of putative intersectional hybrid JM1. A: Inflorescence with large bract (or small leaf). B: Inflorescence with small bract or no bract. Bars = 50 mm.

において両親特有のバンドが検出され、これら 5 系統がいずれも雑種であることが確認された (Fig. 24A). 次に、推定雑種における細胞質の遺伝を調査するために、いくつかの cpDNA と mtDNA 領域の CAPS 分析を行った. その結果、cpDNA 領域において *trnK-3914F-trnK-2R/Xba* のプライマー/制限酵素組み合わせ (Fig. 24B), mtDNA 領域において *nad4exon1-nad4exon2/Xba* のプライマー/制限酵素組み合わせ (Fig. 24C) により多型が得られ、いずれも種子親のシャシャンボと同様のバンドパターンを示した.

フローサイトメトリーによる倍数性解析を行った結果、全ての推定雑種は両親とほぼ同じ位置にピークが認められ、四倍体と推測された. 核 DNA 含量を算出した結果 (Table 10), VB4x-1 (1.30 pg/2C) と 'Spartan' (1.19 pg/2C) の交雑により得られた推定雑種 JM1~4 は両親の中間の値を示した (JM1~4: 1.20~1.27 pg/2C). 一方、JM5 (1.21 pg/2C) の核 DNA 含量は、花粉親の 'Spartan' と差がなかったものの、種子親の VB4x-2 (1.11 pg/2C) とは有意な差が認められた. また、茎頂の染色体観察の結果、全ての推定雑種が 48 本の染色体を有していることが確認された (Fig. 25).

推定雑種 4 系統 (JM1, 3, 4 および 5) とそれらの両親の花粉染色稔性を調査した (Table 11). 'Spartan' の花粉染色稔性 (74.0%) は他と比較して有意に高い値を示した. シャシャンボにおいては VB4x-1 (54.0%) が VB4x-2 (29.5%) と比較して有意に高く、推定雑種においては JM1 (57.4%) と JM4 (61.3%) が JM3 (29.8%) と JM5 (18.3%) よりも有意に高い

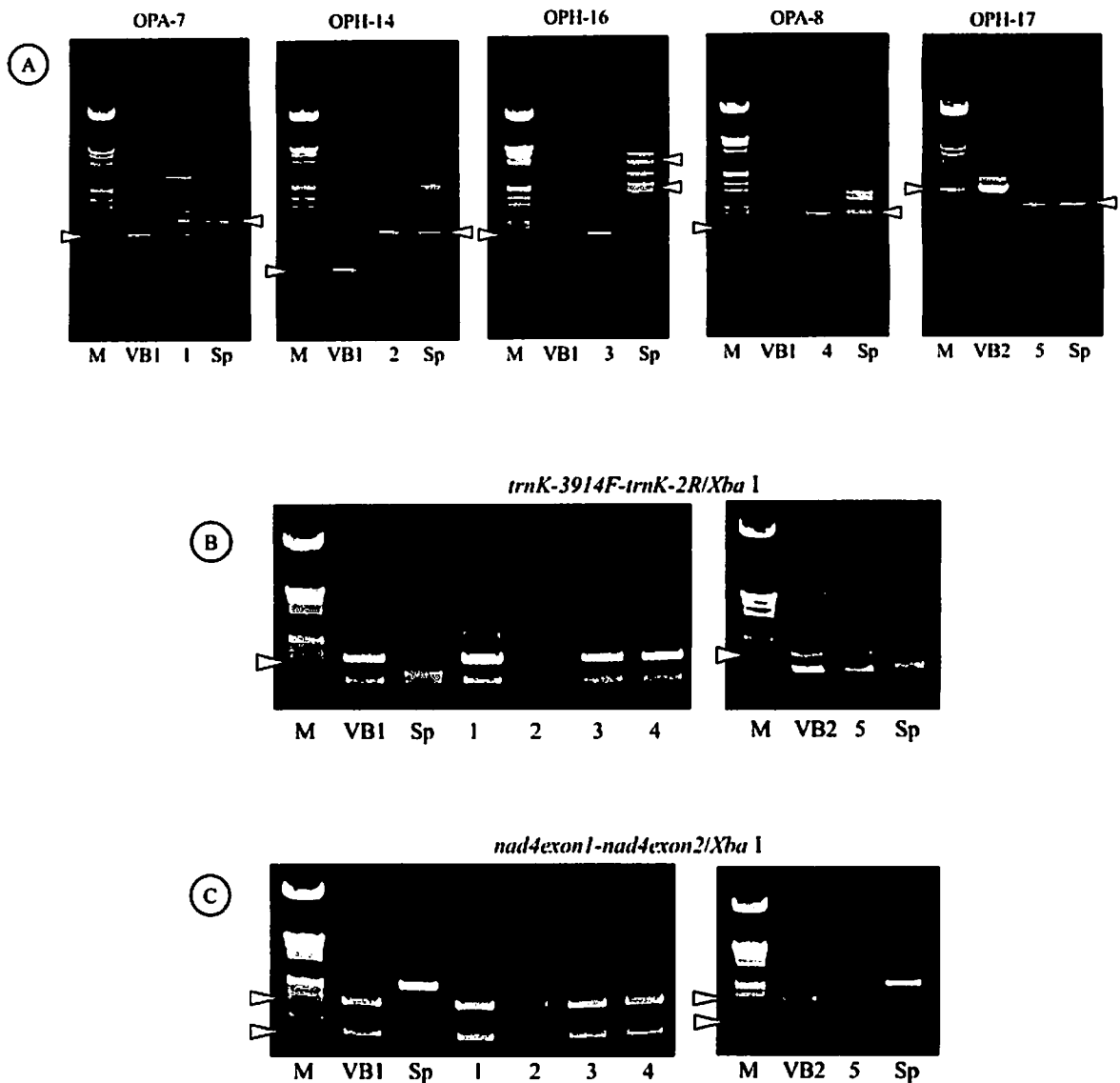


Fig. 24 RAPD and CAPS analyses among putative intersectional hybrids in *Vaccinium*. A: RAPD analysis of the seedlings obtained from the cross between shashanbo and highbush blueberry. B: Restriction pattern of the Xba I -digested *trnK-3914F-trnK-2R* regions of chloroplast genomes. C: Restriction pattern of the Xba I -digested *nad4exon1-nad4exon2* regions of mitochondrial genomes. M: 100-bp ladder marker. VB1, VB2: shashanbo. 1-5: putative intersectional hybrids (JM1-5), Sp: highbush blueberry 'Spartan'. Arrowheads indicate the bands specific to both (A) or one (B, C) parent.

Table 10 Nuclear DNA content in tetraploid shashanbo, highbush blueberry 'Spartan' and their putative hybrids as determined by flow cytometry.

Strains	Nuclear DNA content (pg / 2C)
<i>shashanbo</i>	
VB4x-1	1.30 a ^y
VB4x-2	1.11 d
<i>putative hybrids</i> ^z	
JM1	1.23 ab
JM2	1.27 ab
JM3	1.20 bc
JM4	1.22 ab
JM5	1.21 abc
<i>highbush blueberry</i>	
'Spartan'	1.19 bc

^zSeed parents of JM1 to JM4 were VB4x-1, whereas VB4x-2 was used as a seed parent for JM5.

^yDifferent letters represent significant differences in Tukey's multiple range test, 1% level.

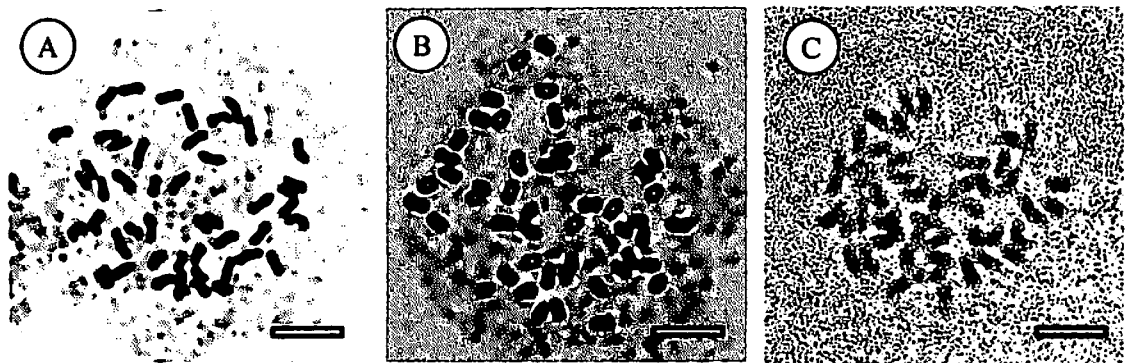


Fig. 25 Somatic chromosomes at metaphase in shoot tips of putative intersectional hybrids and their parents in *Vaccinium*. A: tetraploid shashanbo VB4x-1 , B: highbush blueberry 'Spartan', C: JM1 (putative intersectional hybrid) ($2n = 4x = 48$). Bars = 10 μ m.

Table 11 Comparison of the pollen stainability in tetraploid shashanbo, highbush blueberry 'Spartan' and their putative hybrids.

Strains	Pollen stainability (%) ^y
<i>shashanbo</i>	
VB4x-1	54.0 b ^x
VB4x-2	29.5 c
<i>putative hybrids</i> ^z	
JM1	57.4 b
JM3	29.8 c
JM4	61.3 b
JM5	18.3 d
<i>highbush blueberry</i>	
'Spartan'	74.0 a

^zSeed parents of JM1, JM3 and JM4 were VB4x-1, whereas VB4x-2 was used as a seed parent for JM5.

^y(well filled and evenly stained pollen grains / total pollen grains examined) * 100.

^xDifferent letters represent significant differences in Tukey's multiple range test, 1% level.

花粉染色稔性を示した。また、低い花粉染色稔性を示した JM3 と JM5 では、変形してつぶれた花粉や酢酸カーミンで完全に染色されない花粉が多数観察された (Fig. 26)。

最後に、果実成分を分析した結果、推定雑種 JM1 (2.0 mg cyanidin 3-glucoside equivalents \cdot g⁻¹ FW), JM4 (1.2 mg cyanidin 3-glucoside equivalents \cdot g⁻¹ FW) および JM5 (1.1 mg cyanidin 3-glucoside equivalents \cdot g⁻¹ FW) における果実全体のアントシアニン含量は、'Spartan' (0.7 mg cyanidin 3-glucoside equivalents \cdot g⁻¹ FW) よりも有意に高く、VB2x-1 (3.5 mg cyanidin 3-glucoside equivalents \cdot g⁻¹ FW) と比較して低い値を示した (Fig. 27A)。また、'Spartan' (21.9 mg cyanidin 3-glucoside equivalents \cdot g⁻¹ FW) の果皮のアントシアニン含量は、JM1 (14.9 mg cyanidin 3-glucoside equivalents \cdot g⁻¹ FW) と JM5 (6.4 mg cyanidin 3-glucoside equivalents \cdot g⁻¹ FW) に比べて有意に高かった (Fig. 27B)。一方、JM1 と JM5 の果肉にはアントシアニンの蓄積が確認されたが、'Spartan' では検出されなかった (Fig. 27C)。また、果実全体と果皮では、全ての供試材料において 15 種類のアントシアニンが確認された (Fig. 27A, B)。しかしながら、JM1 の果肉では Delphinidin 3-glucoside, Cyanidin 3-glucoside, Cyanidin 3-arabinoside, Petunidin 3-glucoside, Peonidin 3-glucoside および Peonidin 3-arabinoside の 6 種類、JM5 の果肉では Delphinidin 3-glucoside, Cyanidin 3-glucoside, Petunidin 3-galactoside, Petunidin 3-glucoside, Peonidin 3-glucoside および Peonidin 3-arabinoside の 6 種類は検出されなかった (Fig. 27C)。また、総ポリフェ

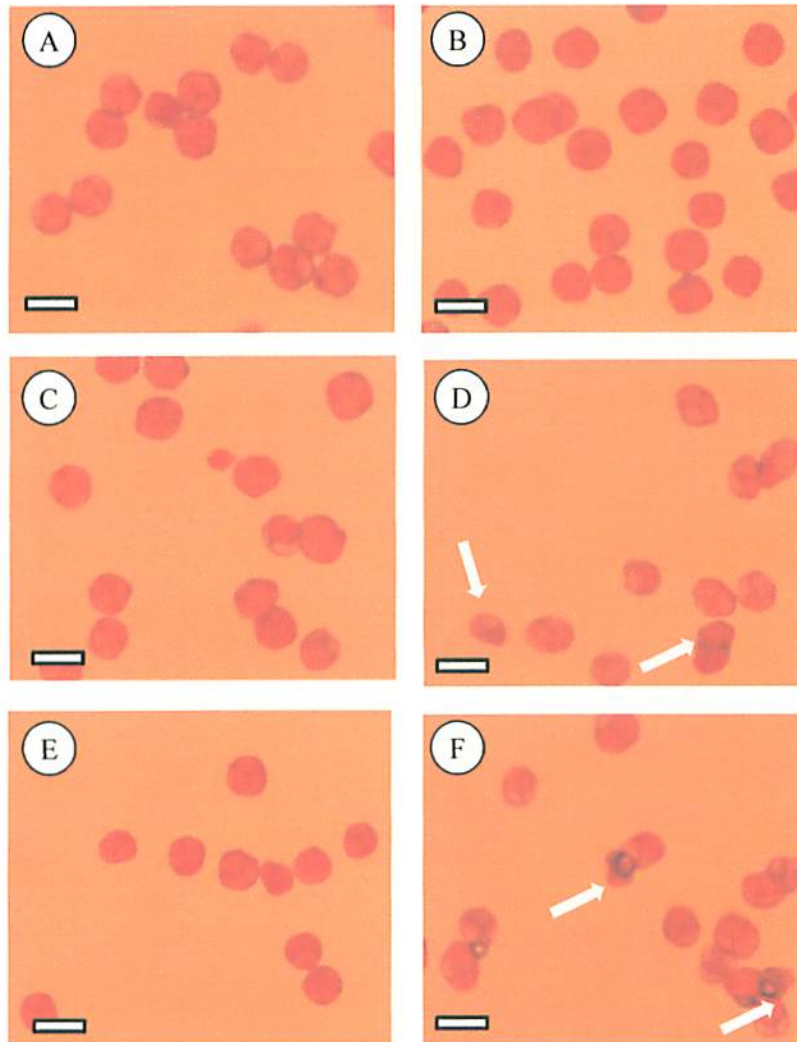


Fig. 26 Comparison of the pollen morphology in tetraploid shashanbo VB4x-1, highbush blueberry 'Spartan' and their putative intersectional hybrids. A: tetraploid shashanbo VB4x-1, B: highbush blueberry 'Spartan', C-F: putative intersectional hybrids (C: JM1, D: JM3, E: JM4, F: JM5). Arrows indicate the shriveled pollen with abnormal shapes. Bars = 50 μ m.

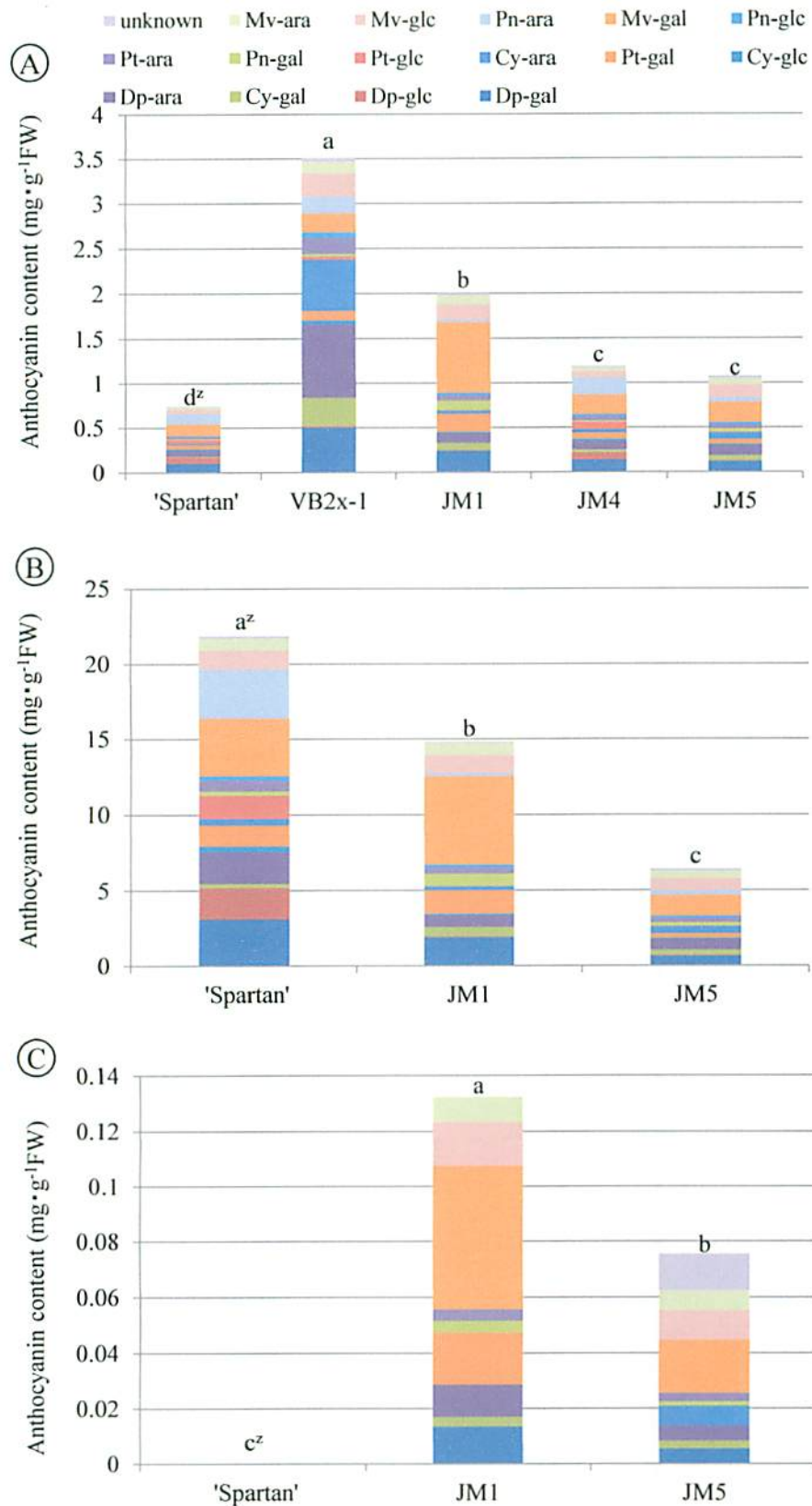


Fig. 27 Comparison of the anthocyanin content and composition of fruits in highbush blueberry 'Spartan', shashnbo VB2x-1 and putative intersectional hybrids (JM1, 4, 5). A: whole fruit, B: peel C: pulp. ^zDifferent letters represents significant differences in Tukey's multiple range test, 1% level.

ノール含量は VB2x-1 (26.7 mg gallic acid · g⁻¹ DW), JM1 (25.7 mg gallic acid · g⁻¹ DW), JM4 (27.5 mg gallic acid · g⁻¹ DW) および JM5 (24.8 mg gallic acid · g⁻¹ DW) が ‘Spartan’ (11.6 mg gallic acid · g⁻¹ DW) と比較して有意に高い値を示した (Fig. 28A). 同様に, 抗酸化能も VB2x-1 (104.1 μmol Trolox equivalents · g⁻¹ DW), JM1 (142.4 μmol Trolox equivalents · g⁻¹ DW), JM4 (117.7 μmol Trolox equivalents · g⁻¹ DW) および JM5 (110.5 μmol Trolox equivalents · g⁻¹ DW) が ‘Spartan’ (68.6 μmol Trolox equivalents · g⁻¹ DW) と比較して有意に高く, JM1 は VB2x-1, JM4 および JM5 に比べて有意に高い値を示した (Fig. 28B).

考察

本章では染色体倍加した四倍体シャシャンボと四倍体ハイブッシュブルーベリー ‘Spartan’ との交雑により四倍体節間雑種を育成した. *Cyanococcus* 節内において染色体倍加個体は倍数性の同じ異種と容易に交雑する (Chavez · Lyrene, 2009b). 実際に, Dweikat · Lyrene (1991) は, 二倍体の *V. elliotii* を花粉親として四倍体の南部ハイブッシュブルーベリー ‘O’Neal’ と交雑した結果, 受粉 1 花当たりの獲得実生数が 0.01 であったのに対し, コルヒチン処理により得られた *V. elliotii* の同質四倍体 FL519 を花粉親とした場合では 3.86 であったと報告している. また, Lyrene (2011) と Lyrene · Olmstead

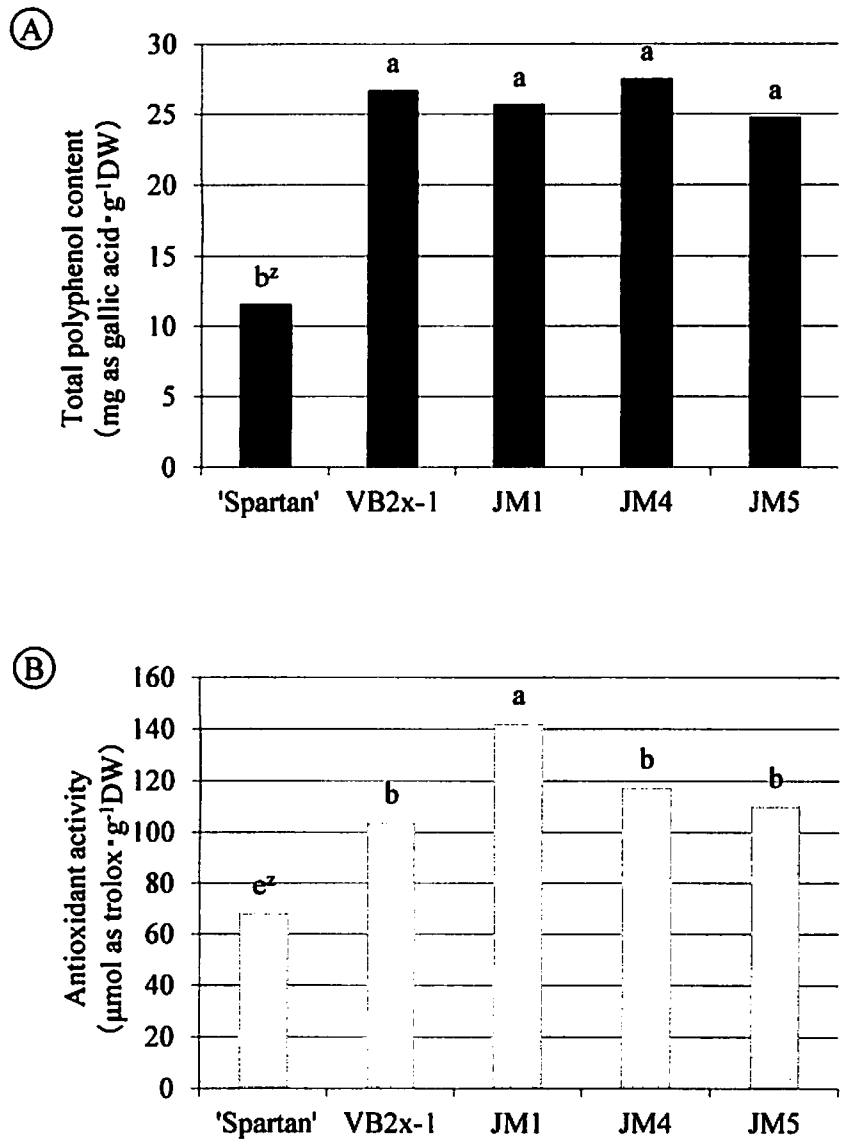


Fig. 28 Comparison of the total polyphenol content (A) and antioxidant activity (DPPH) (B) of fruits in highbush blueberry 'Spartan', shashnbo VB2x-1 and putative intersectional hybrids (JM1, 4, 5). ^zDifferent letters represent significant differences in Tukey's multiple range test, 1% level.

(2012) は節間交雑においても，四倍体個体間の交雑により雑種を獲得している．多くの植物種において，胚乳発生異常が種間交雑を妨げる生殖的隔離の原因となっている（大西・木下，2010）．これまでに，Endosperm Balance Number 仮説（Johnston ら，1980）や Polar Nuclei Activation 仮説（Nishiyama・Yabuno，1978）等により，種間交雑における正常な胚乳発生には母親ゲノムと父親ゲノムのバランスが重要であると報告されている．本章の節間交雑において雑種獲得に成功した要因の一つも，四倍体個体間で交雑したことで胚乳における両親ゲノムのバランスが適正に維持されたことにあると考えられる．

一方，四倍体シャシャンボと‘Spartan’の節間交雑における受粉方法の影響を調査したところ，除雄により花粉管伸長が抑制され，完全種子数が減少することが明らかになった．ハイブッシュブルーベリーでは自家および他家受粉の花粉管ともに，受粉後 24 時間（Miller ら，2011）または 48 時間以内（Krebs・Hancock，1988）に花柱基部に達する．本章では，除雄を行った花において花柱基部に達した花粉管数が除雄を行わなかった花と比較して顕著に少ないことを明らかにした．これは受粉 96 時間後における観察結果であるため，除雄を行った花の花粉管は伸長速度が低下したのではなく，花柱の途中で伸長が停止したものと考えられた．甘果オウトウ（*Prunus avium*）（Hedhly ら，2009）とニセアカシア（*Robinia pseudoacacia*）（Peng ら，2012）においては，除雄により着果率は減少したものの，柱頭から花柱基部における花粉管の挙動に除雄しな

い花との差異は認められなかったと報告されている。交配における着果率の減少や花の老化促進には、花の傷害に応答して生成されるエチレンが関与するとされているが(Hedhlyら, 2009; O'Neill, 1997), 花粉管伸長に及ぼす除雄の影響は明らかになっていない。また, Birrenkott・Stang (1989) は, クランベリー (*V. macrocarpon*) において花粉管伸長を抑制する要因として花柱内の栄養状態, 花粉の養分欠乏および花粉のホルモンの拮抗等を指摘しているが, それらの除雄との関係は不明である。このように, 報告事例が少なくはっきりしたことは今後の研究進展を待ちたいが, スノキ属植物における本節間交雑の組み合わせにおいては, 花の除雄は花粉管伸長の抑制と完全種子数の減少に関連性が認められ, 四倍体シャシャンボとハイブッシュブルーベリー 'Spartan' の節間交雑における雑種獲得の一因は除雄を行わずに受粉したことにあると考えられた。今後は, 除雄による花粉管伸長抑制の機序解明が必要と思われる。

本章では, 実生の樹高が約 5cm に達した播種 4 か月後に落葉タイプの実生を選抜したが, その後 DNA マーカーによる解析と形態調査の結果, これらが雑種であることが確認された。したがって, 本章における常緑性のシャシャンボを種子親とし落葉性のハイブッシュブルーベリーを花粉親とした交雑において, 後代で出現する落葉タイプの実生は雑種の可能性が高いと思われた。そのため, 幼苗期における低温遭遇時の莖葉色変化を指標とした選抜は, 雑種の早期選抜に有効であると考えられた。また, 節間交雑により獲得した 66 個体の実生

のうち、5個体の雑種は四倍体であることが明らかとなった。一方、残りの61個体についてもフローサイトメトリーにより四倍体であることを確認したが（データ未掲載）、これらは接ぎ木による生育促進を図っておらず、ほとんどが開花に至っていない。現在、常緑タイプの個体は26個体が生存しているが、その樹姿および葉の形態はシャシャンボとの区別が困難であり、2013年に開花に至った3樹の花もシャシャンボに酷似していた。そのため、形態的特徴の観察結果を元にとすると、これらの四倍体実生は自家受粉により生じた可能性が考えられる。今後は、本交配組み合わせにおいて獲得した常緑タイプの雑種特性を明らかにするために調査を継続するとともに、常緑タイプの雑種を落葉タイプと同様に早期選抜する手法の開発が必要である。

本章で獲得した雑種は、常緑性のシャシャンボと落葉性のハイブッシュブルーベリー‘Spartan’の中間的な形態的特徴を示した。節間雑種は、‘Spartan’の開花終了後に開花が始まった。節間雑種は、ブルーベリーよりも開花が遅いことから、*V. arboreum* (Chavez・Lyrene, 2010)と同様に、晩霜害を回避できると考えられる。また、Lyrene (1997)は種間雑種MIK (*V. darrowi* × *V. arboreum*)と南部ハイブッシュブルーベリーの交雑により、ラビットアイブルーベリーの極晩生品種よりも成熟が遅い個体を獲得している。本研究で得られた節間雑種の果実成熟期は、ハイブッシュブルーベリー‘Spartan’よりも遅く、ラビットアイブルーベリーの晩生品種とほぼ同時期であった。日本のブルーベリー栽培における深刻な問題の

一つに、ハイブッシュブルーベリーの主要品種の成熟期が梅雨（6～7月）と重なり、高品質な果実の生産が困難なことが挙げられる（Tamada, 1996）。したがって、梅雨明け後に成熟する節間雑種は、重要な遺伝資源になると考えられる。また、本節間雑種およびそれらの後代を利用した秋季のブルーベリー生産は、果実収穫期間を拡大し市場価格の高いオフシーズンのブルーベリー栽培の実現につながるものと思われる。

近年、育種目標として果実の栄養や機能性が注目されている（Scalzoら, 2005; Wangら, 2012b）。ブルーベリー果実の高い抗酸化能には、アントシアニンや他のフラボノイド化合物が寄与している（Wangら, 2012b）。ビルベリーは果皮と果肉の両方にアントシアニンを含むがブルーベリーは主に果皮にのみ含まれる（Lee・Wrolstad, 2004; Riberaら, 2010; Riihinenら, 2008）。そのため、ブルーベリーの新鮮重当たりのアントシアニンはビルベリーと比較して少ないことが明らかとなっている（Riihinenら, 2008）。ブルーベリーの抗酸化能を高める手段の一つは、果実の大きい栽培品種の果肉に抗酸化物質を蓄積させることである。本章において、節間雑種の果肉は赤色を帯びアントシアニンの蓄積が確認されたことから、シャシャンボの形質が遺伝したものと思われた。また、節間雑種の総ポリフェノール含量と抗酸化能は‘Spartan’と比較して有意に高い値を示したことから、果肉に蓄積したアントシアニン等のポリフェノール類がそれらに寄与しているものと思われた。また、雑種果実を食べた際に、えぐみと果皮の厚さを感じたことから、ポリフェノール含量の高い値が反映し

ているものと思われた。さらに、節間雑種の果実は‘Spartan’と比較して小型であったものの、JM1とJM4の可溶性固形物含量は‘Spartan’と比較して高い値を示した。以上の結果、本研究で得られた節間雑種は、糖含量が高く機能性成分に富むブルーベリー品種育成のための遺伝資源として期待される。

本章で獲得した実生は、概して両親の中間的な形態学的特徴および生理学的特徴を示したことに加え、RAPD分析の結果から節間雑種であることを確認した。大部分の顕花植物において、核DNAは両親に由来し、葉緑体DNAは母性遺伝する（Tsukayaら、2003；Yangら、2000）。しかしながら、ブルーベリーの属するツツジ科においては、細胞質DNAの父性遺伝が報告されている（Ureshino、2008）。本章では、CAPS分析により節間雑種の細胞質の遺伝を調査した結果、細胞質の母性遺伝が確認された。このことは、*V. darrowi*と*V. corymbosum*の交雑により得られた種間雑種後代において、mtDNAが母性遺伝するというHaghighi・Hancock(1992)の結果と一致した。

また、節間雑種における花粉染色稔性は、他種と同様に系統間差異が認められた。Chavez・Lyrene(2010)は、節間雑種の花粉染色稔性(5.8%)が、両親(*V. darrowi*, 95.8%：*V. arboreum*, 92.2%)と比べて顕著に低いことを明らかにしており、Brooks・Lyrene(1998)も同様に、*V. darrowi* × *V. arboreum*の節間交雑による雑種第一代の花粉染色稔性の平均がわずか0.9%であったと報告している。これらの節間雑種における低い花粉稔性は、両節間の染色体構造の分化に起因する低頻度の二価染色形成および多数の減数分裂異常が要因と考えられ

る (Brooks・Lyrene, 1995, 1998; Chavez・Lyrene, 2010; Lyrene, 1991). スノキ属植物における二倍体節間雑種のほとんどは不稔であるが, 同質四倍体間の節間交雑後代では, 高い稔性を示すことが知られており (Lyrene・Olmstead, 2012), Rousi (1963) はクロマメノキ ($2n=4x=48$, *Vaccinium* 節) とハイブッシュブルーベリー ($2n=4x=48$, *Cyanococcus* 節) の節間交雑により稔性を有する雑種を獲得している. Lyreneら (2003) は, ハイブッシュブルーベリーとクロマメノキの交雑により得られた後代における高い稔性 (Rousi, 1966) は, 仮に, 両親が同質四倍体で異質倍数体の雑種第一代が同親対合により配偶子を形成したとすれば, 最も理解しやすいとしている. 本章においても, 四倍体シャシャンボと四倍体のハイブッシュブルーベリー 'Spartan' の同質倍数体間交雑の結果, 異質四倍体後代が生じ, 同親対合により稔性を有する雄性配偶子が形成されたと推察された. また, 四倍体節間雑種においては花粉稔性に系統間差異が認められている (Lyrene, 2011; Rousi, 1963). 本研究で得られた四倍体節間雑種においても同様の結果が得られたが, 高い稔性を示した雑種系統はハイブッシュブルーベリーへの戻し交雑が容易であり後代を獲得できるものと思われた. 一方, 四倍体シャシャンボ VB4x-1 と VB4x-2 の花粉染色稔性には有意差が認められ, 核 DNA 含量においても同様に有意な差が観察された. この要因として第 1 に, 四倍体シャシャンボは種子へのコルヒチン処理により獲得しており, その種子は数個体の二倍体シャシャンボ自生株の果実より採取したため, それらの遺伝的差異が有意差に反映され

たと思われる。第 2 に、四倍体シャシャンボは試験管内において種子をコルヒチン添加培地で培養することにより獲得したため、ソマクローナル変異が発生した可能性が考えられる。第 3 に、核 DNA 含量の差異から VB4x-2 が異数体または細胞キメラである可能性も否定できないため、今後、染色体数および組織・器官ごとの倍数性の再確認を行う必要があると思われる。

以上の結果、本章ではスノキ属植物における *Bracteata* 節と *Cyanococcus* 節の種との交雑に成功し、節間雑種を獲得した。また、シャシャンボとブルーベリーの交雑においては、除雄により花粉管伸長が抑制され、完全種子数が減少することが明らかになり、種子親と花粉親の倍数性を揃え、除雄をせずに交配することが雑種獲得の要因になったことが示唆された。さらに、本章で開発した幼苗期の茎葉色変化を指標にした雑種の早期選抜法は、ブルーベリー育種の効率化を図るうえで有用な手法になると考えられる。本章で獲得した雑種は、環境適応性に優れ、高糖度で高い機能性を有する果実を着生し、果実の収穫期間拡大を実現する新しいブルーベリー品種育成のための育種母本として有用と考えられる。今後は、減数分裂、雌性稔性、果実特性および自根樹の生育調査等を行う必要がある。

摘要

染色体倍加した四倍体シャシャンボと四倍体ハイブッシュブルーベリー‘Spartan’との交雑により四倍体節間雑種を育成した。また、シャシャンボとブルーベリーの交雑においては、除雄により花粉管伸長が抑制され、完全種子数が減少することが明らかになり、種子親と花粉親の倍数性を揃え、除雄をせずに交配することが雑種獲得の要因になると推察された。さらに、本章で開発した幼苗期における低温遭遇時の茎葉色変化を指標とした雑種の早期選抜法は、ブルーベリー育種の効率化を図るうえで有用な手法になると考えられる。本章では、DNA マーカーと形態調査による雑種性解析を行った。節間雑種における形態的特徴、開花期および果実成熟期は両親の中間となった。フローサイトメトリーと染色体観察による倍数性調査の結果、これらの雑種は四倍体であることが明らかとなった。節間雑種のうち 4 系統が結実し、このうち 2 系統は高い花粉染色稔性を示した。また、注目すべきことに節間雑種のうち 2 系統は‘Spartan’と比較して高い可溶性固形物含量を示し、全ての雑種系統の果肉はシャシャンボと同様に赤色を呈しアントシアニンの蓄積が確認され、高い総ポリフェノール含量と抗酸化能を示した。これらの雑種は、環境適応性に優れ、高糖度で高い機能性を有する果実を着生し、果実の収穫期間拡大を実現する新しいブルーベリー品種育成のための育種母本として有用と考えられる。

第 4 章

スノキ属植物における高 pH 適応系統の 効率的な選抜法の開発

緒言

スノキ属の種は好酸性植物であり，強い樹勢を維持するためには pH 5.8 以下の酸性土壌が必要である (Hancock ら, 2008). そのため，ブルーベリーの生育を限定する最も強い無生物的要因の一つとして pH6 以上の高 pH 耐性が挙げられる (Chandler ら, 1985). 日本の果樹園の多くは，カルシウムを含む化成肥料の施用により土壌 pH 5.5 またはそれ以上に達しており，pH の高い土壌に定植されたブルーベリーは生育不良の症状が現れている (Suzuki ら, 1999). ブルーベリー育種家の多くは好酸性に注目してこなかったが，スノキ属植物の野生種には土壌 pH 適応性の改良に有用な遺伝的変異が存在している (Rowland ら, 2011). 日本産スノキ属植物のうち，常緑性低木のシャシャンボは関東地方南部から沖縄県に自生し，果実は食用に供される (Tsuda ら, 2013). 本種は，根域が広く耐乾性を有しており，ブルーベリーと比較して高い土壌 pH に適応すると報告されている (刈住, 1979; 國武ら, 2006; Luby ら, 1991). 第 3 章において，染色体倍加した四倍体シャシャンボとハイブッシュブルーベリー 'Spartan' との交雑により四倍体節間雑種を育成した (Tsuda ら, 2013).

本節間雑種は、高 pH を含む様々な土壌条件に適応するハイブッシュブルーベリー品種育成のための育種母本として有望と思われる。

これまでに、圃場や温室内において高 pH 土壌 (Finn ら, 1987, 1993a, 1993b) を含む多様な土壌 (Korcak, 1986; Korcak ら, 1982) に耐性を有するブルーベリーの選抜が行われてきた。これらの手法は優良系統の選抜に有効であるが、広大な面積を必要とし、植物の成長や環境条件を制御するために多大な経費を要する。一方、試験管内における評価・選抜系は、圃場や温室等の選抜環境と比較して高いレベルの環境制御を行うことが可能である (Finn ら, 1991)。さらに、ブルーベリーは、実生が小さく成長が穏やかであるため、試験管内において植物体全体を供試して選抜試験を行うことのできる数少ない果樹の一つである。そのため、Finn ら (1991) は、慣行の育種プログラムに試験管内選抜系を組み込むことがブルーベリーの高 pH 土壌耐性の改良に効果的であるとしている。

本章の目的は、第 1 に、試験管内において培養シュートを利用し、スノキ属における効率的な高 pH 適応性系統の選抜法を開発することである。第 2 に、シャシャンボとハイブッシュブルーベリー 'Spartan' の交雑により得られた節間雑種における高 pH 土壌への適応性を調査することである。

材料および方法

植物材料として、節間雑種 4 系統 (JM1, JM2, JM3 および JM4), それらの両親であるシャシャンボ 2 系統 (VB4x-1 と VB4x-2: 種子親) およびハイブッシュブルーベリー ‘Spartan’ (花粉親) を供試した。Tetsumura ら (2008) と山内 (佐藤) ら (2012) の方法に従い、発芽直前の腋芽を滅菌した後、2% スクロース、0.8% 寒天および $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ zeatin を添加した MW 培地 (pH4.8) に置床し、 25°C 、24 時間連続照明下 ($38 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) で多芽体を誘導した。2 か月ごとに同培地で多芽体を継代培養し、実験に必要なシュート数になるまで継代培養を繰り返した。

試験管内 pH 試験には、JM1, JM2, JM3, JM4 および ‘Spartan’ のシュートを供試した。なお、シャシャンボは多芽体誘導が困難であり試験可能なシュートを得ることができなかった。シュートは 20 mm に調整し、植物成長調整物質無添加の 1.0% (w/v) 寒天 (Wako) および 2% (w/v) ショ糖を含む 1/2MW 培地を 40 mL 分注した 300 mL 容プラントボックス (60×60×100 mm, CUL-JAR300; Iwaki, Tokyo, Japan) に 5 本ずつ植え付けた。培地 pH はオートクレーブ後に、HCl または NaOH により pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 および 8.0 に調整した。1 処理区当たり 15 本のシュートを供試し、3 反復行った。培養開始から 8 週間後、シュートの生存率、最長根長および最高シュート長を調査した。発根率は 2 週間間隔で 8 週間後まで調査した。

根端組織の細胞活性を fluorescein diacetate (FDA) と PI の二重染色 (Jones・Senft, 1985) により調査した。試験管内 pH

試験と同様の方法で得た発根している JM1, JM4 および 'Spartan' のシュートを供試した。発根したシュートを植物成長調整物質と寒天無添加の 2% (w/v) ショ糖を含む 1/2MW 培地を 40 mL 分注した 300 mL 容プラントボックスに 3 本ずつ植え付けた。液体培地の pH はオートクレーブ後に, HCl または NaOH により pH 4.0, 6.0 および 8.0 に調整した。Suzuki らの方法(1999)に従い, アセトンに溶解した $5.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ FDA 溶液と滅菌水に溶解した $40.0 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PI 溶液を調整後に 5°C で保存し, 使用直前にそれらを混合して FDA/PI 溶液 ($5.0 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ FDA, $12.5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PI) を作成した。同液体培地で 3 または 6 時間培養後に, 根を FDA/PI 溶液に 5 分間浸漬した。染色後, 滅菌水で洗浄した根端を FDA と PI 検出用のフィルターを装備した蛍光顕微鏡 (BX51, Olympus, Tokyo, Japan) により観察した。1 処理区当たり少なくとも 30 個の根端を観察し, 3 反復行った。

土壌 pH 試験では, 試験管内試験の結果を元に前期と同じ方法で増殖した JM1, JM4 および 'Spartan' のシュートを供試した。シュートは 20 mm に調整後, バーミキュライトとパーライトを等量混合した用土を充填したセルトレー (20×20×40 mm) に挿し木した。セルトレーは Jiffy half trays (270×270×60 mm) 内に置き, 透明のプラスチックカバー (270×270×60 mm) で覆いをした。Jiffy half trays 内に 0.1% Hyponex 溶液 (N-P-K, 5-10-5; Hyponex Japan Corp, Osaka, Japan) を満たし, セルトレー底部から給水させた (山内 (佐藤) ら, 2012)。Hyponex 溶液の pH は H_2SO_4 または NaOH により pH 4.0 と pH 8.0 に調

製し，2日おきに溶液を全て入れ替えた．1処理区当たり11本のシュートを供試し，3反復行った．培養開始から6週間後，シュートの生存率，最長根長および最高シュート長を調査した．

全ての培養条件は25°C，16時間日長（光合成有効光量子束密度 $60 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ）とした．結果は，Tukeyの多重検定またはt検定により統計処理を行った．

結果および考察

試験管内で誘導した多芽体から切り出したシュートを pH の異なる培地で培養した結果，シャシャンボとハイブッシュブルーベリー‘Spartan’の節間雑種のシュートにおける pH への反応には系統間差が認められた（Table 12, Fig. 29）．培養8週間後に節間雑種と‘Spartan’の生存率を調査したところ，pH 4.0～7.0 においては全てのシュートが生存していた（Table 12）．一方，pH 8.0 では顕著な差が認められ，節間雑種（JM1: 100%，JM2: 96%，JM3: 84%，JM4: 100%）が‘Spartan’（24%）と比較して有意に高い値を示した．根の形成は概ね培養2週間後より開始したが，培地 pH の上昇により発根開始は遅延した（Fig. 30）．JM1, 3, 4 および‘Spartan’の発根率は，培養4週間後にほぼ最高値に達したが，JM2は培養8週間後まで発根率が上昇した．また，各系統とも pH の上昇に伴い発根率が低下した．高 pH における発根率は系統間差が顕著

Table 12 Effects of medium pH on survival rate, the length of the longest root and the length of the longest shoot in inter-sectional hybrids (JM1-4) and 'Spartan'^z

Clones	medium pH				
	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0
			Survival rate (%)		
JM1	100 ns ^y	100	100	100	100
JM2	100 ns	100	100	100	96
JM3	100 ns	100	100	100	84
JM4	100 ns	100	100	100	100
'Spartan'	100 a	100 a	100 a	100 a	24 b
			Length of the longest root (mm)		
JM1	43.8 a ^y	45.2 a	43.2 a	43.4	5.4 b
JM2	2.6 b	2.4 b	1.7 b	8.8 a	1.3 b
JM3	27.2 a	9.9 ab	8.1 b	8.7 b	1.0 b
JM4	47.1 ns	43.2	47.2	43.4	37.8
'Spartan'	2.9 ns	11.5	4.6	13.1	0
			Length of the longest shoot (mm)		
JM1	16.4 a ^y	18.9 a	18.9 a	15.1 b	13.2 b
JM2	8.7 ns	11.1	9.4	12.9	8.9
JM3	15.8 ns	10.5	10.6	13.0	11.6
JM4	19.8 ns	19.7	20.7	22.1	21.2
'Spartan'	13.8 ns	13.2	12.4	13.0	10.5

^zObservation was conducted after 8 weeks of culture.

^yDifferent letters, a-b, represent significant differences among different pH levels within the same clones in Tukey's multiple range test at 5% level and ns show not significantly difference.

^xDifferent letters, x-y, represent significant differences among different clones within the same pH level in Tukey's multiple range test at 5% level and NS shows not significantly difference.

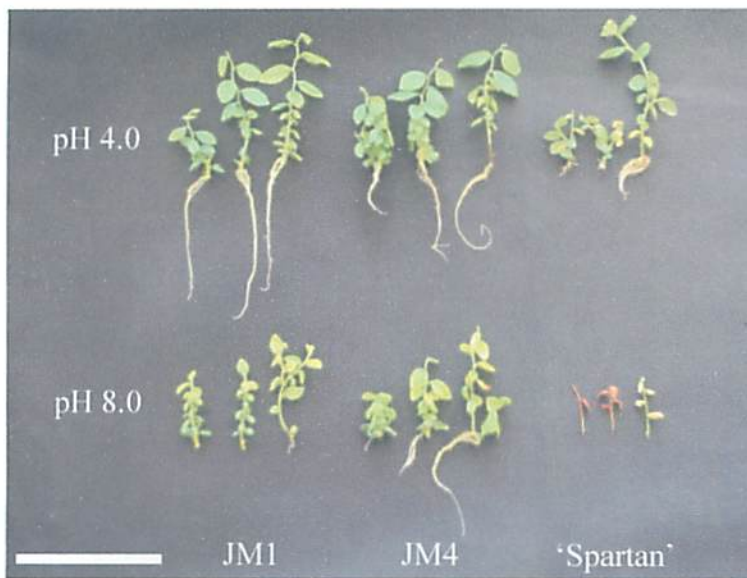


Fig. 29 Effects of medium pH on plant growth of two intersectional hybrids (JM1 and JM4) and 'Spartan'. 8 weeks after culture of *in vitro* shoots of 20 mm long. Bar = 5 cm.

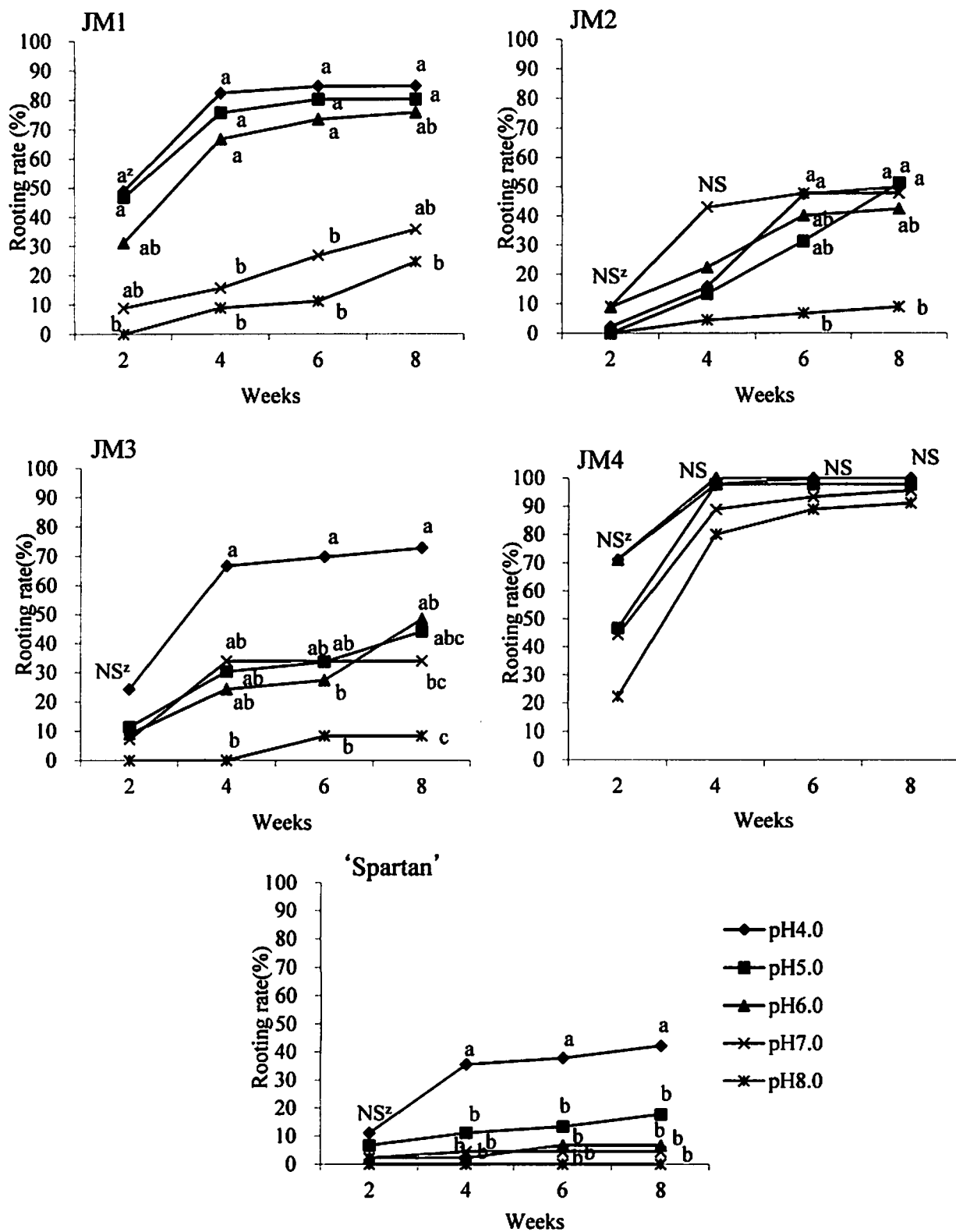


Fig. 30 Effect of medium pH on rooting in four inter-sectional hybrids (JM1-4) and 'Spartan' at 8 weeks after culture. ^zDifferent letters represents significant differences among different pH within same period (weeks) in Tukey's multiple range test, 5% level.

であり、培養 8 週間後の pH 8.0 における発根率は、JM1, JM2, JM3 および 'Spartan' において、それぞれ 24, 9, 8 および 0% であり、JM4(91%) がそれらよりも有意に高い値を示した。また、JM4 は全ての pH において高い発根率を示し(91~100%)、異なる pH 間に有意差は認められなかった。最長根長は、JM1, JM2 および JM3 において pH の上昇に伴い有意に短くなった (Table 12)。また、'Spartan' の最長根長に及ぼす pH の影響は明確でなかったが、JM4 は全ての pH において同程度の最長根長を示した。pH 5.0 と 6.0 においては JM1 と JM4、pH 7.0 と 8.0 においては JM4 が他と比較して有意に最長根長が高い値を示した。最長シュート長は、JM2, JM3, JM4 および 'Spartan' においては pH の影響は認められなかった (Table 12)。しかしながら、JM1 の最長シュート長は、pH 4.0~6.0 において pH 7.0 と 8.0 と比較して有意に高い値を示した。また、JM4 は pH 7.0 と 8.0 において他と比較して有意に最長根長が高い値を示し、最長シュート長と同様の結果となった。

根の活性に及ぼす pH の直接的な影響を評価するために、JM1, JM4 および 'Spartan' の発根したシュートを pH の異なる 3 種類の液体培地 (pH 4.0, 6.0 および 8.0) に移植し、培養 3 時間および 6 時間後に根を FDA/PI 溶液で染色した (Fig. 31)。培養 3 時間後、各系統は全ての根において FDA による明瞭な緑色蛍光が観察され、pH や系統の違いによる根の活性や形態に変化は認められず、全ての pH において根が活性を維持していることが確認された (データ未掲載)。培養 6 時間後では 'Spartan' と JM1 の根は全ての pH において障害を受

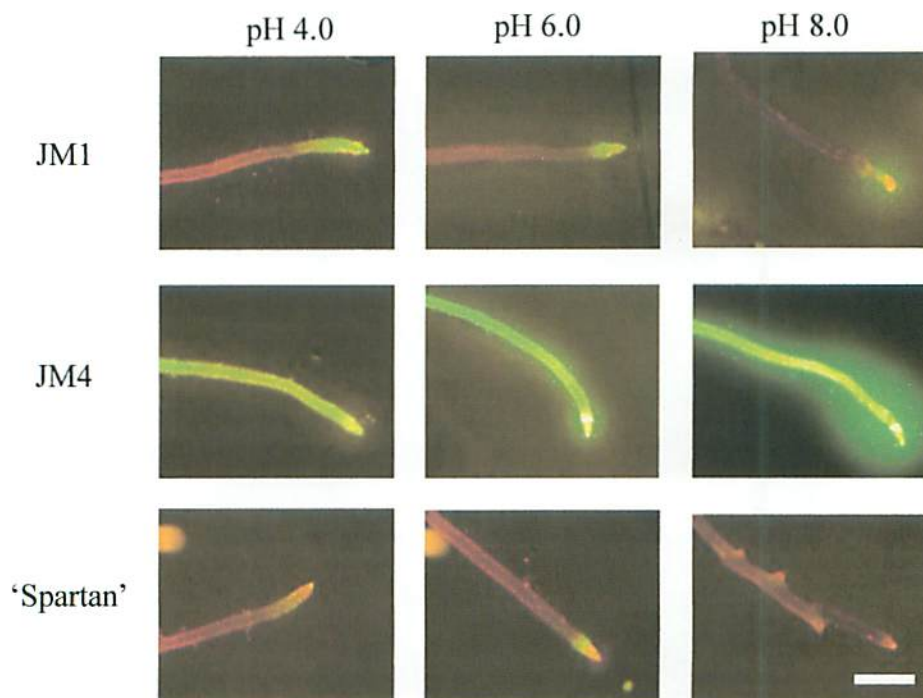


Fig. 31 Effect of medium pH on root viability of two intersectional hybrids (JM1 and JM4) and 'Spartan'. Roots of the *in vitro* plantlets were soaked in liquid media with different pH levels for 6 h. Then roots were stained with FDA/ PI solution. Green and yellow cells were evaluated as viable, whereas red cells were scored as damaged. Bar = 500 μ m.

けたが、JM4は全てのpHで障害を受けなかった。これらの結果は、JM4が本手法において広範囲のpHに対して耐性を有しており、JM1はpHの変化に適応性が低いものの‘Spartan’と比較すると適応性が高いことを示した。スノキ属におけるFDA/PI染色による根組織の観察は、活性を有する細胞と障害を受けた細胞を区別して可視化することができる簡便な手法である（Suzukiら、1999）。本実験では、FDA/PIが高pH耐性を有する遺伝子型を発見するための有用な手法であることを明らかにした。今後は、遺伝子型による高pH耐性の差異を含め、高pH耐性の機序を明らかにするために、更なる研究が必要である。スノキ属において、高いpHは、試験管内における種子発芽、実生の樹勢と乾物重（Finnら、1991）およびシュート成長（Wolfら、1986）に悪影響を及ぼすことが確認されている。また、スノキ属において、培地pHが発根や根の増殖に及ぼす影響に関する情報は乏しいが（Meinersら、2007）、本実験の結果、ブルーベリーの節間雑種を利用した試験管内選抜法により、根の高pHに対する耐性を評価できることが明らかとなった。

次に、試験管内で育成したシュートを利用した発根試験により、JM1、JM4および‘Spartan’における高pH土壌耐性を調査した（Table 13）。JM1とJM4の生存率はpHの影響を受けなかったが、‘Spartan’の生存率はpH 8.0においてpH 4.0と比較して有意に低い値を示した。pH 4.0においては全ての系統がほぼ100%の生存率を示した。一方、pH 8.0においては‘Spartan’の生存率は73%に低下し、JM1(100%)とJM4(91%)

Table 13 Effects of soil pH on survival rate, rooting rate, the length of the longest root and the length of the longest shoot in inter-sectional hybrids (JM1 and JM4) and 'Spartan'^z

Clones	Soil pH	
	4.0	8.0
	Survival rate (%)	
JM1	97 ns ^y	100 a NS ^x
JM4	94	91 a NS
'Spartan'	100	73 b **
	Rooting rate (%)	
JM1	78 a	30 ab *
JM4	91 a	69 a NS
'Spartan'	24 b	0 b -
	Length of the longest root (mm)	
JM1	22.3 a	6.0 b **
JM4	20.4 a	14.6 a NS
'Spartan'	2.2 b	0 b -
	Length of the longest shoot (mm)	
JM1	15.5 a	9.6 a **
JM4	14.6 a	8.6 a *
'Spartan'	4.9 b	1.7 b *

^zObservation was conducted after 6 weeks of culture.

^yDifferent letters, a-b, represent significant differences among clones within the same pH level in Tukey's multiple range test at 5% level and ns show not significantly difference.

^xAsterisk represents significant differences between pH 4.0 and 8.0 within the same clones in t-test at 1% (**), or 5% (*) level and NS show not significantly difference.

と比較して有意に低い値を示した。また、全系統の発根率は、pH 8.0において pH 4.0と比較して低い値を示したが、JM4の発根率は pH 4.0 (91%) と pH 8.0 (69%) で有意な差は認められなかった。発根率は、pH 4.0では JM1 と JM4 が 'Spartan' よりも有意に高い値を示したが、pH 8.0では JM1 と 'Spartan' に有意差は認められなかった。次に、最長根長を調査した結果、pH 間差異と系統間差異のいずれも発根率と同様の傾向を示した。一方、最長シュート長は全系統において pH 8.0 よりも pH 4.0 で有意に高い値を示した。また、いずれの pH においても、'Spartan' と比較して節間雑種が有意に高い値を示した。以上の結果、土壌 pH 試験が概して試験管内試験と同じ結果を導くこと、およびブルーベリーの節間雑種の発根率には pH と遺伝子型が影響すること確認された。

ブルーベリー研究者は、本種における高 pH 土壌への感受性に関する包括的な理論を定式化しようとしてきた (Korcak, 1989)。彼らは、ブルーベリーの栽培に適した培地等を含めた栽培システムの開発に成功したが、様々な土壌条件に適応する品種の開発には至っていない (Finn ら, 1991)。Finn ら (1991) は、ブルーベリーにおいて高 pH 耐性を有する種子および実生の試験管内選抜法を開発した。しかしながら、ブルーベリー果実の成熟期において種子の発育は不均一であり発芽が揃わないため、種子はこの選抜方法に必ずしも適しているとは言えない (Suzuki ら, 1999)。そのため、再現性の高い安定的な結果を得るためには、試験管内選抜における多芽体シュートの利用が効果的であり不可欠である。本手法の利

点は、選抜した優良系統をマイクロプロパゲーションにより短期間に大量増殖が可能であり、増殖した個体を利用して直ちに圃場試験を開始できることにある。

本章ではハイブッシュブルーベリーとシャシャンボとの節間交雑により高 pH 耐性を有する系統の作出に成功するとともに、多芽体シュートを利用し、FDA/PI 染色と組み合わせた試験管内における効率的な高 pH 耐性系統の選抜法を開発した。これらの結果は、土壌試験の結果と一致したことから、多芽体シュートの発根率と FDA/PI 染色による根の活性評価を利用した試験管内選抜法が、省スペースで短期間に高 pH 土壌耐性を有する遺伝資源を選抜することができる有用な手法であることを示した。節間雑種 JM4 は高 pH 土壌に適応する可能性が示されたため、今後は、本系統の高 pH に適応する機序解明を行うとともに、高 pH 土壌における継続的な生育調査が必要である。さらに、JM4 を今後の育種計画において利用していくためには、本系統の開花・結果習性および果実品質等の調査が重要となるであろう。

摘要

シャシャンボとハイブッシュブルーベリー ‘Spartan’ の節間雑種の多芽体シュートを用いて、試験管内における高 pH 適応系統の効率的な選抜方法について検討した。試験管内試験の結果、異なる培地 pH への反応は 4 系統間で差異が認められ

た。特に、高 pH 条件における発根率は系統間差が顕著であり、培養 8 週間後の pH8.0 における発根率は、JM1, JM2, JM3 および 'Spartan' において、それぞれ 24, 9, 8 および 0% であり、JM4 (91%) がそれらよりも有意に高い値を示した。また、JM4 は全ての pH において高い発根率を示し (91~100%)、異なる pH 間に有意差は認められなかった。また、節間雑種の根における同様の差異は、試験管内における FDA/PI 染色を利用した根の細胞活性評価によっても確認された。これらの結果は土壌試験の結果と一致したことから、多芽体シュートの発根率と FDA/PI 染色による根の細胞活性を指標とした試験管内選抜法は、省スペースで短期間に高 pH 耐性を有する系統を選抜することができる有効な手法であることが示唆された。さらに、pH8.0 において高い発根率を示した節間雑種 JM4 は、高 pH 土壌耐性を有するブルーベリー品種育成のための有望な育種素材になるものと思われた。

第 5 章

総合考察

スノキ属植物は世界中に 150～400 種分布しており，特にヒマラヤ，ニューギニアおよび南米のアンデス地方に多数の種が認められ，現在では，南米起源が有力とされている（Luby ら，1991；Retamales・Hancock，2012）．スノキ属は 30 節に分類されるが（Luby ら，1991），栽培品種は全て *Cyanococcus* 節の種を元に育種されてきた（Galletta・Ballington，1996）．現在，日本で栽培されているブルーベリーの多くは主に米国で品種改良されたものである．一方，国内で育成されたブルーベリーは 17 品種のみであり（農林水産省，<http://www.hinsyu.maff.go.jp/>，2013），それらの多くは放任受粉由来の実生から選抜されており計画的な育種は全く行われていない．しかしながら，ブルーベリーと近縁のスノキ属植物は 19 種（10 節）自生しており（山崎，1989），これらのブルーベリー育種および栽培への利用が期待される．そこで本研究では，日本産スノキ属植物を利用したブルーベリーの品種改良に関して検討した．

日本人の果物消費量は，1960 年には一人当たり 1 日平均約 60 g であったが，高度経済成長期に消費量が増加し，1970 年には約 120 g に達したものの，現在では増減せずに同程度で推移している（小川，2013）．一方，果樹生産出荷統計（農林水産省，<http://www.maff.go.jp/>，2013）によると 1973 年における果樹の結果樹面積，収穫量および出荷量がそれぞれ

374,300 ha, 6,533,000 t, 5,770,000 tであったのに対し, 2012年にはそれぞれ 195,200 ha, 2,717,000 t および 2,417,000 t となり, いずれも半減している. このように日本の果樹産業は明らかな衰退傾向にあるが, ブルーベリー栽培は 1980 年代から急速に普及し, 2009 年における栽培面積は 1,041 ha, 果実収穫量 2,259 t に達しており, 現在に至るまで栽培面積および果実収穫量ともに増加傾向が続いている (農林水産省生産局果樹花き課, <http://www.maff.go.jp/>, 2011). この消費拡大の一因は, 1990 年代にブルーベリー果実の高い抗酸化能が明らかになったことにある (Prior ら, 1998). また, 最近のコホート研究においては, ブルーベリー果実の摂取により, 心筋梗塞の低減 (Cassidy ら, 2013) や 2 型糖尿病予防 (Muraki ら, 2013) 効果があることが確認されている.

しかしながら, 国内のブルーベリー栽培普及に伴い, オウトウシヨウジョウバエによる果実の被害 (内野, 2005), ウイルス病の発生 (Isogai ら, 2009, 2012), 夏季の長期乾燥による株の枯死 (堀内ら, 2011) 等, 栽培上の課題が指摘され始めている. そのため, 今後のブルーベリー産業の持続的発展のためには日本の環境および栽培条件に適した多様な品種の開発が必要である. そこで, 日本に自生するスノキ属植物を利用したブルーベリーの育種を展開するに当たり, 本研究では常緑性のシャシャンボに注目した. 本種は, 関東地方南部から沖縄県に自生し, 果実は甘みがあり食用に供される (Iwagaki ら, 1977). また, シャシャンボはブルーベリーと比較して土壌適応性が広いため, 暖地において北部ハイブツ

シュブルーベリーの台木として利用されており（國武ら，2006），米国においても高pH土壌耐性を有する遺伝資源として注目されている（Lubyら，1991）．さらに，本種は東南アジアの亜熱帯地域まで分布が確認されていることから（山崎，1989），耐暑性，耐乾性および少低温要求性を有するブルーベリー品種育成のための遺伝資源としても期待される．そこで，シャシャンボとハイブッシュブルーベリーの交雑による雑種獲得を試みたが，本交雑組み合わせでは異倍数体間による交雑障壁が発生したため，染色体倍加した四倍体シャシャンボを種子親，四倍体ハイブッシュブルーベリー‘Spartan’を花粉親として交雑を行った結果，四倍体節間雑種の獲得に成功した．

スノキ属の二倍体野生種は有用形質を持つものの，四倍体のハイブッシュブルーベリーとの交雑においては，トリプロイドブロックにより雑種獲得が困難である．多くの植物種において，胚乳発生異常が種間交雑を妨げる生殖的隔離の原因となっている（大西・木下，2010）．これまでに，種間交雑における正常な胚乳発生には母親ゲノムと父親ゲノムのバランスが重要であると報告されている（Johnstonら，1980；Nishiyama・Yabuno，1978）．この両親ゲノムのバランスを規定する候補因子として有力なのが，ゲノムインプリンティングを示す遺伝子である（Haig・Westoby，1991）．ゲノムインプリンティングは，遺伝子刷り込みとも呼ばれ，父親と母親由来の対立遺伝子が識別され異なる遺伝子発現レベルを示す現象である（大西・木下，2010）．この現象のもつ生物学的意

義について結論は出されていないが、コンフリクト仮説は (Moore・Haig, 1991), 胎児と骨盤に対する成長促進と成長抑制の変化に注目し、有性生殖という生殖様式をもつ生物において、雄は子孫を大きくするように、雌は1個体当たりの負担を減らし子孫の個体数を増やすために各個体を小さくするような力がかかると解釈している。コンフリクト仮説は、植物の種間交雑において父親ゲノムと母親ゲノムのバランスが崩れた時の、母親ゲノムが過剰な場合には胚乳サイズが小さくなり、父親ゲノムが過剰な場合には胚乳サイズが大きくなるという表現型を良く説明している (大西・木下, 2010)。したがって、本研究の節間交雑により雑種獲得に至った一因は、同倍数体間で交雑したことで両親間のインプリンティング遺伝子の発現レベルが同等になり、種間交雑における胚乳発生異常による生殖的隔離が解消されたことにあると推察された。

また、スノキ属植物において、除雄が花粉管伸長や種子発育に及ぼす影響はこれまでに報告されていないが、本研究では除雄した花において花柱上部または中部で花粉管の伸長が停止した。甘果オウトウ (Hedhly ら, 2009) とニセアカシア (Peng ら, 2012) では、除雄により着果率は減少したものの、除雄の有無に関わらず花粉管は花柱基部まで伸長したと報告されている。交配における着果率の減少や花の老化促進には、花の傷害に応答して生成されるエチレンが関与するとされているが (Hedhly ら, 2009; O'Neill, 1997), 花粉管伸長に及ぼす除雄の影響は明らかになっていない。しかしながら、本研究では花の除雄により花粉管伸長が抑制され完全種子数が

減少したことから、四倍体シャシャンボとハイブッシュブルーベリー‘Spartan’の節間交雑における雑種獲得の一因は、除雄を行わずに受粉したことにあると考えられた。

本研究で獲得した節間雑種の果実は、果肉が赤色を呈しアントシアニンの蓄積が確認されるとともに、高いポリフェノール含量と抗酸化能を示した。また、節間雑種は、ブルーベリーと同程度の可溶性固形物含量を示し明らかな甘味が感じられたが、ポリフェノールに起因すると思われるえぐみを呈した。果肉にアントシアニンが蓄積する本雑種は、機能性の高いブルーベリー品種育成のための育種母本として有望であるが、優良品種育成には更なる改良が必要である。現在、節間雑種へのハイブッシュブルーベリーの戻し交雑を行い数百個体の実生を獲得し育成中である（データ未掲載）。今後は、これらの戻し交雑第一代から、果肉にアントシアニンが蓄積し食味に優れる系統やポリフェノール含量と抗酸化能の高い系統の選抜を進める予定である。

ブルーベリーは土壌 pH が好適範囲（ハイブッシュブルーベリー：pH 4.3～4.8，ラビットアイブルーベリー：pH 4.3～5.3）（石川・小池，2006）よりも高くなると鉄欠乏によるクロロシスを呈し、枝葉と根の生育量が低下する（杉山ら，1989；片倉・廣田，2003）。しかしながら、日本の国土において前記の強酸性を示す土壌は限られているため、一般的に、園地の土壌 pH は硫黄華やピートモスなどの資材により矯正されている。ピートモスは入手や使用後の処理が容易で再利用が可能であるが（浦山，2009），pH を調整するためには大

量に投入する必要があるため開園に際して初期投資が増大する。また、ピートモスのほとんどは輸入に依存しており、その乱獲が沼沢地の生態系に影響を及ぼし新たな環境問題を誘発しつつある (Stamps・Evans, 1997)。したがって、ブルーベリーの栽培面積および地域の拡大のためには、土壌適応性に優れる品種の育成が重要である。本研究で開発した多芽体シュートの発根率と FDA/PI 染色による根の細胞活性を指標とした試験管内選抜法は、省スペースで短期間に高 pH 耐性を有する系統を選抜することができる有効な手法であることが明らかとなった。また、本手法により選抜した節間雑種 JM4 は、高 pH 耐性を有するブルーベリー品種育成のための育種母本として利用できるものと思われた。今後は、本手法を応用し、耐乾性、耐暑性および塩類耐性等を有する遺伝子型の選抜を進めていく予定である。

ブルーベリーの交雑育種では、交配から品種発表まで 15～20 年を要する (Retamales・Hancock, 2012)。育種の成果を得るまでに長期間を要するが、序章で述べた米国のブルーベリー育種の事例のように、限られた遺伝資源を用いた育種の継続により品種の遺伝的多様性は失われる。そのため、米国では、現在、有望形質を有する 26 種のスノキ属植物が選抜され (Hancock ら, 2008)、これらを利用して遺伝的多様性を拡大するとともに、土壌適応性、環境適応性、耐病性および果実品質の向上に焦点を当てた育種が行われている (Die・Rowland, 2013)。以上のことから、本研究においても、新たに複数の四倍体シャシャンボとハイブッシュブルーベリー品種を用いた

節間交雑により雑種獲得を試み、遺伝子プールの拡大を図る必要がある。この際には、本研究で開発した幼苗期の茎葉色変化を指標とした雑種の早期選抜法が、育種の効率化を図るうえで有用な手法になると考えられる。また、近年、多くの植物種で用いられている分子育種の技術は、ブルーベリーにおいても遺伝的改良の速度を加速するツールとなることが期待される (Die・Rowland, 2013)。

日本列島は南北に長く亜熱帯から亜寒帯までの広い気候帯を含んでいるが、全ての気候帯にスノキ属植物が分布している。これは、同属の種が多様な環境条件に適応可能なことを示しており、ブルーベリーの環境適応性改良の遺伝資源として有望である。これらには、二倍体、四倍体および六倍体が確認されており (津田, 2007; 執行ら, 2010), 常緑性と落葉性に分類される。また、ブルーベリーの果皮色は青色、果肉色は白色であるのに対し、日本産スノキ属植物では、果皮色は赤色 [アクシバ (*V. japonicum*)], 青色 (アラゲナツハゼ) および黒色 (ナツハゼ), 果肉色は紫色 (シャシャンボ, ナツハゼ) および白色 (アラゲナツハゼ) 等多様であり、育種素材および園芸素材としても貴重である。本研究では、シャシャンボとブルーベリーの雑種を獲得したが、その他の日本産スノキ属植物もブルーベリーの遺伝的改良を行ううえで有用な素材になると考えられる。

以上より、本研究では日本産スノキ属植物シャシャンボとハイブッシュブルーベリーの節間雑種を育成した。本雑種は、日本の環境条件に適応する機能性の高いブルーベリー品種育

成のための育種母本として重要な役割を果たすであろう。また、本研究で開発した染色体倍加法，交雑における無除雄受粉法，雑種の早期選抜法および試験管内での高 pH 適応系統の選抜・評価法は，今後のブルーベリー育種の効率化に貢献するものと思われる。

要約

日本における果樹産業は、輸入果実の増加、消費者指向の多様化および担い手不足などにより衰退傾向にあるが、ブルーベリー栽培は1980年代から急速に普及し、今日に至るまで栽培面積および果実収穫量ともに増加している。現在、日本のブルーベリー産業を支えているのは主に米国で育種された品種群である。近年、国内のブルーベリー栽培普及に伴い、病虫害による果実の食害や夏季の長期乾燥による株の衰弱等、栽培上の課題が指摘され始めている。また、米国で育成された優良品種が必ずしも国内で高い評価を得ていないという現状がある。これまでに、国内で育成された品種は17品種に過ぎないが、日本にはブルーベリーと近縁のスノキ属植物は19種自生しており、これらのブルーベリー育種および栽培への利用が期待される。

そこで本研究では、第1に、日本産スノキ属植物を利用したブルーベリーの育種を行うための基礎的知見を得ることを目的として、ナツハゼおよびシャシャンボの果実の機能性を調査しブルーベリーと比較した。第2に、日本産スノキ属植物の効率的な染色体倍加方法の確立を目的として、試験管内で増殖した多芽体由来シュートへの有糸分裂阻害物質処理を試みた。第3に、染色体倍加したシャシャンボとハイブッシュブルーベリーとの交雑を行い、節間雑種の獲得を試みた。また、育成した推定雑種の雑種性、生育相、形態的特性、生殖稔性および果実の品質評価を行った。第4に、シャシャン

ポとハイブッシュブルーベリーの節間雑種の多芽体シュートを用いて、試験管内における高 pH 適応システムの効率的な選抜方法を検討した。

1. 日本産スノキ属植物とブルーベリー栽培品種の機能性成分を調査した。その結果、ナツハゼ、シャシャンボおよびラビットアイブルーベリーの総アントシアニン含量に有意な差は認められなかった。一方で、ナツハゼとシャシャンボの総ポリフェノール含量はブルーベリーと比較して高いことが明らかとなった。また、ナツハゼとシャシャンボはブルーベリーと比較して HL-60 細胞の増殖抑制効果が高いことが判明した。特に、高い抗酸化能を示したナツハゼはアポトーシスにより HL-60 細胞の増殖が強く抑制されたものと推察された。以上の結果、ナツハゼおよびシャシャンボ果実に含まれるアントシアニンを含む総ポリフェノールが高い抗酸化能に寄与しており、それらが HL-60 細胞の増殖抑制に関与しているものと推察された。

2. 日本産スノキ属植物とブルーベリー栽培品種において、多芽体由来シュートを用いた染色体倍加を検討した。オリザリンとコルヒチンを様々な濃度や時間でシュートに処理し、その後 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ zeatin を添加した MW 培地で培養した。培養したシュートの腋芽から新たに発生したシュートの倍数性を解析した。染色体倍加個体の誘導率は有糸分裂阻害物質の種類、処理濃度、処理時間および供試した種により異なったが、本

処理条件内では，オリザリンの方がコルヒチンより高い値を示した．特に，0.005%・24時間でオリザリン処理を行った場合，北部ハイブッシュブルーベリー‘Berkeley’，スノキ，コケモモおよびクロマメノキにおいてそれぞれ23.3，5.6，40.0および57.8%の染色体倍加個体を得られた．これらの染色体倍加個体は，ラビットアイブルーベリー‘Homebell’台木に接ぎ木した後，順調な生育を示している．以上のように，多芽体由来シュートへのオリザリン処理により，スノキ属植物の染色体倍加個体を効率的に誘導できることが明らかになった．

3. 四倍体シャシャンボと四倍体ハイブッシュブルーベリー‘Spartan’との交雑により四倍体節間雑種を育成した．また，シャシャンボとブルーベリーの交雑においては，除雄により花粉管伸長が抑制され，完全種子数が減少することが明らかになり，両親の倍数性を揃え，除雄をせずに交配することが雑種獲得の要因になると推察された．さらに，本章で開発した幼苗期における低温遭遇時の茎葉色変化を指標とした雑種の早期選抜法は，ブルーベリー育種の効率化を図るうえで有用な手法になると考えられる．また，雑種における形態的特徴，開花期および果実成熟期は両親の中間となり，フローサイトメトリーと染色体観察による倍数性調査の結果，これらの雑種は四倍体であることが明らかとなった．雑種のうち4系統が結実し，このうち2系統は高い花粉染色稔性を示した．また，注目すべきことに雑種のうち2系統は‘Spartan’と比

較して高い可溶性固形物含量を示し，全ての雑種系統の果肉はシャシャンボと同様に赤色を呈しアントシアニンの蓄積が確認され，高い総ポリフェノール含量と抗酸化能を示した．これらの雑種は，環境適応性に優れ，高糖度で高い機能性を有する果実を着生し，果実の収穫期間拡大を実現する新しいブルーベリー品種育成のための育種母本として有用と考えられる．

4. シャシャンボとハイブッシュブルーベリー‘Spartan’の節間雑種の多芽体シュートを用いて，試験管内における高 pH 適応系統の効率的な選抜方法について検討した．試験管内試験の結果，異なる培地 pH への反応は 4 系統間で差異が認められた．高 pH における発根率は系統間差が顕著であり，培養 8 週間後の pH 8.0 における発根率は，JM1, JM2, JM3 および ‘Spartan’ において，それぞれ 24, 9, 8 および 0% であり，JM4 (91%) がそれらよりも有意に高い値を示した．また，JM4 は全ての pH において高い発根率を示し (91~100%) ，異なる pH 間に有意差は認められなかった．また，節間雑種の根における同様の差異は，試験管内における FDA/PI 染色を利用した根の細胞活性評価によっても確認された．これらの結果は土壌試験の結果と一致したことから，多芽体シュートの発根率と FDA/PI 染色による根の細胞活性を指標とした試験管内選抜法は，省スペースで短期間に高 pH 土壌耐性を有する系統を選抜することができる有効な手法であることが示唆された．さらに，pH 8.0 において高い発根率を示した節間雑種 JM4 は，高

pH土壤耐性を有するブルーベリー品種育成のための有望な育種素材になるものと思われた。

Breeding studies on blueberries using native species of genus
Vaccinium in Japan

Hirotoishi Tsuda

Summary

In Japan, blueberry culture and its fruit consumption have increased annually. Japanese blueberry cultivation has depended on the cultivars developed in the United States. In order to further extend the production area, it is necessary to develop new cultivars that are adapted to high humidity, high temperature and various soil conditions in Japan. Nineteen native species of the genus *Vaccinium* are distributed from Hokkaido to the Kyushu region. These species are of interest to blueberry breeders for several reasons such as wide and deep root system, higher pH adaptability, high polyphenol content and diverse fruit characters.

The objectives of the study described in this doctoral thesis were: 1), to evaluate Natsuhaze and Shashnbo as breeding materials by investigating fruit characteristics, 2) to establish an efficient method of *in vitro* chromosome doubling of multiple shoots in some *Vaccinium* species, 3) to produce intersectional hybrids from the crosses between colchicine-induced tetraploid shashanbo and highbush blueberry 'Spartan', and perform a

detailed investigation of the several hybrids, 4) to develop the efficient *in vitro* screening for higher soil pH adaptability in *Vaccinium*.

1. Antioxidant Activities and Anti-Cancer Cell Proliferation Properties of Natsuhaze (*V. oldhamii*), Shashanbo (*V. bracteatum*) and Blueberry Cultivars.

Antioxidants are abundant in blueberries, and while there are many studies concerning the bioactive compound of fruit, it is only recently that the wild *Vaccinium* species has attracted attention for their diverse and abundant chemical components. The aim of this study was to investigate the bioactive compounds of blueberry cultivars and wild species found in Japan. Among the five extracts of the *Vaccinium* species, Natsuhaze was found to be the most effective at inhibiting the growth of HL-60 human leukemia cells *in vitro*. Although all ethanol extracts showed a growth inhibitory effect on HL-60 cells, the degree of the effects differed among the species. The extract of Natsuhaze induced apoptotic bodies and nucleosomal DNA fragmentation in the HL-60 cells. Of the extracts tested, that of Natsuhaze and Shashanbo contained the largest amount of total polyphenols and showed the greatest antioxidant activity, but the anthocyanin content of Natsuhaze and Shashanbo were similar to that of rabbiteye blueberry (*V. virgatum*). The results showed that total polyphenols contributed to the high antioxidant activity and

growth inhibitory effect on HL-60 human leukemia cells of Natsuhaze and Shashanbo extracts.

2. Induction of Polyploids in *Vaccinium* Using Oryzalin and Colchicine Treatments.

To establish an efficient polyploid induction method, we carried out *in vitro* chromosome doubling of multiple shoots in some *Vaccinium* species. Multiple shoots were aseptically treated with two antimitotic agents, oryzalin and colchicine, at different concentrations and times. After these treatments, the shoots were successively cultured on MW medium containing $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ zeatin. The ploidy levels of growth shoots were evaluated by both flow cytometry and chromosome counting. The frequency of chromosome-doubled plant production depended on the kinds of antimitotic agent, treatment concentrations and times, and species. Among the treatment conditions tested, oryzalin induced more chromosome doubling than colchicine. Four species of chromosome-doubled plants were obtained with 0.005% 24-hour oryzalin treatment at the following frequencies: highbush blueberry (*V. corymbosum*) 'Berkeley': 23.3%, *V. smallii*: 5.6%, *V. vitis-idaea*: 40.0%, *V. uliginosum*: 57.8%. These results suggest that oryzalin is very effective for polyploid induction of multiple shoots in *Vaccinium*.

3. Production of Intersectional Hybrids between

Colchicine-induced Tetraploid Shashanbo and Highbush Blueberry 'Spartan'.

With crosses between colchicine-induced tetraploid shashanbo (section *Bracteata*) and tetraploid highbush blueberry 'Spartan' (section *Cyanococcus*), intersectional hybrids were produced. Flower emasculation inhibited the pollen tube growth and reduced the developed seed number in these crosses. Successful production of intersectional hybrids in the present study can be attributed to the use of the same ploidy level parents and without emasculation in the crosses. Furthermore, the early selection method of hybrids using the color change of leaf and shoot at low temperature as a marker could become a very useful tool in *Vaccinium* breeding. The morphological characteristics, blooming date, and ripening period of the hybrids were intermediate between those of the parents. Ploidy analyses by flow cytometry and chromosome counting revealed that these hybrids were tetraploid. Four hybrids set fruit in the field and these two hybrids showed high pollen stainability. It was noteworthy that fruit of two hybrids had high soluble solids concentration compare with 'Spartan' and the fruit pulp of the hybrids was tinged with red as shashanbo. Furthermore, total anthocyanin content, total polyphenol content and antioxidant activity of hybrids were significantly higher than those of 'Spartan'. These hybrids could be useful in breeding new cultivars with extensive high environmental adaptability, high

sugar content, abundant phytochemicals, as well as expanded ripening period.

4. Efficient *in vitro* Screening for Higher Soil pH Aadaptability in *Vaccinium*.

I tested an efficient *in vitro* method for screening the genotypes with higher pH tolerance using multiple shoots of intersectional hybrids between *V. corymbosum* 'Spartan' and *V. bracteatum*. The response of the 4 hybrid strains tested to different pH levels was clones-dependent *in vitro*. Apparent difference was found in the rooting rate among the hybrid clones even at higher pH levels, the rooting rates of JM4 (91%) at pH 8.0 indicated significantly high value compared with other clones (JM1: 24%, JM2: 9%, JM3: 8%, 'Spartan': 0%). Furthermore, JM4 showed constantly high rooting rates (91–100%) at all pH levels with no significant differences. Similar differences in the root characters of the hybrids were also confirmed by checking the viability of roots using FDA/PI staining after dipping the roots of *in vitro* produced shoots in liquid medium at different pH levels for 6 h. These results suggest that the *in vitro* screening method using the rooting rate of multiple shoots and the viability test of roots by FDA/PI staining as a marker could become very useful tools for the selection of germplasm with tolerance to higher pH within a short time using small planting spaces. In addition, JM4, which

showed a high rooting rate at pH 8.0, could be useful in breeding new cultivars with higher pH tolerance.

謝辞

本研究の遂行並びに本論文の作成をするにあたり、終始御懇篤なる御指導を賜った、宮崎大学農学部教授・國武久登博士、同大学農学部教授・藪谷勤博士、同大学農学部教授・西脇亜也博士、同大学農学部教授・鉄村琢哉博士、本論文の校閲を賜った、宮崎大学工学部准教授・塩盛弘一郎博士に衷心から感謝の意を表します。また、研究を進めるにあたり、御懇切丁寧なご指導と多大なる御助言を頂きました、東海大学農学部教授・小松春喜博士、千葉大学園芸学部名誉教授・三位正洋博士、静岡大学農学部准教授・八幡昌紀博士、福岡県筑後農林事務所八女普及指導センター主任技師・安田喜一博士に深く感謝いたします。

さらに、貴重な実験材料の御提供と多大なる御協力を頂きました宮崎大学農学部准教授・西山和夫博士、同大学農学部准教授・山崎正夫博士、株式会社 P-DESTM・鹿毛哲郎氏、同・吉岡克則氏、同・古賀尚樹氏、同・二又朋則氏、大塚ナーセリー・大塚寛治氏、宮崎県食品開発センター部長・柚木崎千鶴子博士、同・主任技師松浦靖氏、株式会社なな葉コーポレーション・亀長浩蔵氏、同・甲斐孝憲氏、同・吉野勝博氏、同・山本晃三氏に深く感謝の意を表します。また、本研究の遂行にあたり、宮崎大学農学部植物遺伝育種学研究室の専攻生、宮崎大学農学部研究員・矢野美菜子氏、同・布施拓一博士には、多大なる御協力を頂きました。ここに記して心より感謝の意を表します。

最後に、私の研究生活を支えてくれた家族に心からの謝意を記します。

引用文献

- Allum, J.F., D.H. Bringloe and A.V. Roberts. 2007. Chromosome doubling in a *Rosa rugosa* Thunb. hybrid by exposure of *in vitro* nodes to oryzalin: the effects of node length, oryzalin concentration and exposure time. *Plant Cell Rep.* 26:1977-1984.
- Atkinson, R., K. Jong and G. Argent. 1995. Cytotaxonomic observations in tropical *Vaccinieae* (Ericaceae). *Bot. J. Linnean Soc.* 117:135-145.
- Ballington, J.R. 1980. Crossability between subgenus *Cyanococcus* (Gray) Klotzsch and subgenus *Polycodium* (Raf.) Sleumer in *Vaccinium*. *HortScience* 15:419 (Abstr.).
- Ballington, J.R. 1990. Germplasm resources available to meet future needs for blueberry cultivar improvement. *Fruit Var. 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, aglycone-sugars in the fruit of seven species of blueberries. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 112:859-864.
- Birrenkott, B.A. and E.J. Stang. 1989. Pollination and pollen tube growth in relation to cranberry fruit development. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 114:733-737.
- Blakeslee, A.F. and A.G. Avery. 1937. Methods of inducing doubling of chromosomes in plants. *J. Hered.* 28:393-411.

- Blomhoff, R., M.H. Carlsen, L.F. Andersen and D.R. Jacobs. 2006. Health benefits of nuts: Potential role of antioxidants. *Br. J. Nutr.* 96:52-60.
- Boches, P., N.V. Bassil and L.J. Rowland. 2006. Genetic diversity in the highbush blueberry evaluated with microsatellite markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 131:674-686.
- Bouvier, L., F.R. Fillon and Y. Lespinasse. 1994. Oryzalin as an efficient agent for chromosome doubling of haploid apple shoots *in vitro*. *Plant Breed.* 113:343-346.
- Bouvier, L., P. Guerif, M. Djulbic, C. Durel, E. Chevreau and Y. Lespinasse. 2002. Chromosome doubling of pear haploid plants and homozygosity assessment using isozyme and microsatellite markers. *Euphytica* 123:255-262.
- Brazelton, C. 2009. World blueberry acreage and production report. Folsom, CA. United States Highbush Blueberry Council-Industry Relations Committee.
- Brevis, P.A., N.V. Bassil, J.R. Ballington and J.F. Hancock. 2008. Impact of wide hybridization on highbush blueberry breeding. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 133:427-437.
- Brooks, S.J. and P.M. Lyrene. 1995. Characteristics of sparkleberry × blueberry hybrids. *Proc. Florida State Hort. Soc.* 108:337-339.
- Brooks, S.J. and P.M. Lyrene. 1998. Derivatives of *Vaccinium arboreum* × *Vaccinium* section *Cyanococcus*: II. Fertility and fertility parameters. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123:997-1003.
- Canter, P.H. and E. Ernst. 2004. Anthocyanosides of *Vaccinium*

- myrtillus* (Bilberry) for Night Vision-A Systematic Review of Placebo-Controlled Trials. *Survey of ophthalmology* 49:38-50.
- Cassidy, A., K.J. Mukamal, L. Liu, M. Franz, A.H. Eliassen and E.B. Rimm. 2013. High Anthocyanin Intake is Associated with a Reduced Risk of Myocardial Infarction in Young and Middle-Aged Women Clinical Perspective. *Circulation* 127:188-196.
- Chalak, L. and J.M. Legave. 1996. Oryzalin combined with adventitious regeneration for an efficient chromosome doubling of trihaploid kiwifruit. *Plant Cell Rep.* 16:97-100.
- Chandler, C.K., A.D. Draper and G.J. Galletta. 1985. Combining ability of blueberry interspecific hybrids for growth on upland soil. *HortScience* 20:257-258.
- Chavez, D.J. and P.M. Lyrene. 2009a. Interspecific crosses and backcrosses between diploid *Vaccinium darrowii* and tetraploid southern highbush blueberry. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 134:273-280.
- Chavez, D.J. and P.M. Lyrene. 2009b. Production and identification of colchicine-derived tetraploid *Vaccinium darrowii* and its use in breeding. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 134:356-363.
- Chavez, D.J. and P.M. Lyrene. 2010. Hybridization of two diploid *Vaccinium* section *Cyanococcus* species with diploid *Vaccinium arboreum* in section *Batodendron*. *Euphytica* 171:263-272.
- Chen, J., T. Uto, S. Tanigawa, T. Kumamoto, M. Fujii and D.X. Hou. 2008. Expression profiling of genes targeted by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) in macrophages through DNA microarray. *Nutr. Cancer* 60:43-50.

- Cheng, Y.J., W.W. Guo and X.X. Deng. 2002. Inheritance of organelle genomes of the somatic hybrid between Cleopatra mandarin (*Citrus reticulata*) and Flying dragon (*Poncirus trifoliata*). *Acta Genetica Sinica* 29:364-369.
- Connor, A.M., J.J. Luby and C.B.S. Tong. 2002a. Variability in antioxidant activity in blueberry and correlations among different antioxidant assays. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 127:238-244.
- Connor, A.M., J.J. Luby, C.B.S. Tong, C.E. Finn and J.F. Hancock. 2002b. Genotypic and environmental variation in antioxidant activity, total phenolic content, and anthocyanin content among blueberry cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 127:89-97.
- Cooke, D., M. Schwarz, D. Boocock, P. Winterhalter, W.P. Steward, A.J. Gescher and T.H. Marczylo. 2006. Effect of cyanidin-3-glucoside and an anthocyanin mixture from bilberry on adenoma development in the ApcMin mouse model of intestinal carcinogenesis-relationship with tissue anthocyanin levels. *Int. j. cancer.* 119:2213-2220.
- Darrow, G.M. and W.H. Camp. 1945. *Vaccinium* hybrids and the development of new horticultural material. *Bul. Torrey Bot. Club.* 72:1-21.
- Darrow, G.M., W.H. Camp, F.E. Fischer and H. Derman. 1944. Chromosomes in *Vaccinium* and related groups. *Bul. Torrey Bot. Club.* 71:498-506.
- Die, J.V. and L.J. Rowland. 2013. Advent of genomics in blueberry. *Molecular Breeding* 32:493-504.

- Ding, M., R. Feng, S.Y. Wang, L. Bowman, Y. Lu, Y. Qian, V. Castranova, B.H. Jiang and X. Shi. 2006. Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity. *J. Biol. Chem.* 281:17359-17368.
- Doyle, J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities fresh leaf tissue. *Phytochem. Bul.* 19:11-15.
- Draper, A.D. 1997 Blueberry breeding for the southern United States. *Fruit Var. J.* 51:135-138.
- Dumolin-Lapegue, S., M.H. Pemonge and R.J. Petit. 1997. An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants. *Mol. Ecol.* 6:393-397.
- Dunn, B.L. and J.T. Lindstrom. 2007. Oryzalin-induced chromosome doubling in *Buddleja* to facilitate interspecific hybridization. *HortScience* 42:1326-1328.
- Dweikat, I.M. and P.M. Lyrene. 1989. Production and evaluation of synthetic hexaploid in blueberry. *Theor. Appl. Genet.* 77:799-804.
- Dweikat, I.M. and P.M. Lyrene. 1991. Induced tetraploidy in a *Vaccinium elliotii* clone facilitates crossing with cultivated highbush blueberry. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116:1063-1066.
- Eck, P. 1988. Blueberry science. Rutgers Univ. Press. New Brunswick. New Jersey.
- Finkel, T. and N.J. Holbrook. 2000. Oxidants, oxidative stress and biology of ageing. *Nature* 408:239-247.
- Finn, C.E., J.J. Luby, C.J. Rosen and P.D. Ascher. 1987. Screening blueberry genotypes for higher pH tolerance. *HortScience* 22:97

(Abstr.)

Finn, C.E., J.J. Luby, C.J. Rosen and P.D. Ascher. 1991. Evaluation of blueberry germplasm for higher pH tolerance *in vitro*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 116:312-316.

Finn, C.E., J.J. Luby, C.J. Rosen and P.D. Ascher. 1993a. Blueberry germplasm screening at several soil pH regimes. I. Plant survival and growth. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 118:377-382.

Finn, C.E., C.J. Rosen, J.J. Luby and P.D. Ascher. 1993b. Blueberry germplasm screening at several soil pH regimes. II. Plant nutrient composition. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 118:383-387.

Fuentealba, J., A.J. Dibarrart, M.C. Fuentes-Fuentes, F. Saez-Orellana, K. Quiñones, L. Guzmán, C. Perez, J. Becerra and L.G. Aguayo. 2011. Synaptic failure and adenosine triphosphate imbalance induced by amyloid- β aggregates are prevented by blueberry-enriched polyphenols extract. J. Neuroscience Res. 89: 1499-1508.

Fukui, K. 1996. Plant chromosome at mitosis. p. 1-17. In: K. Fukui and S. Nakayama (eds.). Plant Chromosome. Laboratory Methods. CRC Press, Florida.

古田貴音・金好純子・金石新作・山口 聰. 2004. カンキツの処理個体における倍数性の変化と四倍体選抜. 園学雑. 73(別 2):102.

Galletta, G.J. and J.R. Ballington. 1996. Blueberries, Cranberries and lingonberries., p.1-107. In: J. Janick and J.N. Moore (eds.). Fruit breeding, Vol. II : Small fruit crops. Prentice Hall, New York.

Ghahremani-majd, H., F. Dashti, D. Dastan, H. Mumivand, J. Hadian

- and M. Esna-Ashari. 2012. Antioxidant and antimicrobial activities of Iranian mooseer (*Allium hirtifolium* Boiss) populations. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 53:116-122.
- Giovanelli, G. and S. Buratti. 2009. Comparison of polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties. *Food. Chem.* 132:855-864.
- Goldy, R.G. and P.M. Lyrene. 1984. *In vitro* colchicine treatment of 4x blubberies, *Vaccinium* sp. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 109:336-338.
- Gossiau, A. and K.Y. Chen. 2004. Nutraceuticals, apoptosis, and disease prevention. *Nutrition* 20:95-102.
- Haghighi, K. and J.F. Hancock. 1992. DNA restriction fragment length variability in the genomes of highbush blueberry. *HortScience* 27:44-47.
- Haig, D. and M. Westoby. 1991. Genomic imprinting in endosperm: its effect on seed development in crosses between species, and between different ploidy levels of the same species, and its implications for the evolution of apomixis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences.* 333:1-13.
- Hancock, J.F. 2006a. Northern highbush breeding. *Acta Hort.* 715:37-40.
- Hancock, J.F. 2006b. Highbush blueberry breeders. *HortScience* 41:20-21.
- Hancock, J.F. 2012. The 11th North American Blueberry Workers Conference: An Introduction. *J. Fruit Sci.* 12:1-3.
- Hancock, J.F., P. Lyrene, C.E. Finn, N. Vorsa and G.A. Lobos. 2008.

- Blueberries and cranberries, p.115-149. In: J.F. Hancock (eds.),
Temperate fruit crop breeding. Springer, Berlin, Germany.
- Hervet-Hernández, D., J.L. García, J.L. Rosado and I. Goñi. 2011. The
contribution of fruits and vegetables to dietary intake of
polyphenols and antioxidant capacity in a Mexican rural diet:
Importance of fruit and vegetable variety. Food Res. Int.
44:1182-1189.
- Hedhly, A., J.I. Hormaza and M. Herrero. 2009. Flower emasculation
accelerates ovule degeneration and reduces fruit set in sweet cherry.
Sci. Hortic. 119:455-457.
- Hirai, M., S. Yoshimura, T. Ohsako and N. Kubo. 2010. Genetic
diversity and phylogenetic relationships of the endangered species
Vaccinium sieboldii and *Vaccinium ciliatum* (Ericaceae). Plant
Systematics Evol. 287:75-84.
- Ho, K.Y., C.C. Tsai, J.S. Huang, T.C. Lin, Y.F. Hsu and C.C. Lin. 1999.
Antioxidant activity of tannin compounds from *Vaccinium
vitis-idaea* L.. J. Pharm. Pharmacol. 51:1075-1078.
- 堀内尚美・亀有直子・車 敬愛・鈴木 栄・平沢 正・荻原 勲. 2011.
乾燥ストレス下におけるブルーベリー葉の水ポテンシャルおよ
び光合成特性. 園学研. 10:485-490.
- Howard, L.R., J.R. Clark and C. Brownmiller. 2003. Antioxidant
capacity and phenolic content in blueberries as affected by
genotype and growing season. J. Sci. Food Agric. 83:1238-1247.
- 入間順平・十合貴之・坂尾こず枝・山本雅史・福留弘康・川口昭二・
富永茂人・侯 徳興. 2013. ブルーベリー (*Vaccinium* spp.) の品

- 種間におけるアントシアニン組成および抗酸化能の解析. 鹿児島大農報. 63:27-38.
- 石川駿二・小池洋男. 2006. ブルーベリーの作業便利帳. p. 26. 農文協. 東京.
- Isogai, M., K. Ishii, S. Umemoto, M. Watanabe and N. Yoshikawa. 2009. First report of blueberry red ringspot disease caused by blueberry red ringspot virus in Japan. *J. General Plant Pathol.* 75:140-143.
- Isogai, M., N. Tatuto, C. Ujiie, M. Watanabe and N. Yoshikawa. 2012. Identification and characterization of blueberry latent spherical virus, a new member of subgroup C in the genus *Nepovirus*. *Archives of virology.* 157:297-303.
- 伊藤祐司. 2011. 北海道大雪山におけるブルーベリー近縁種ヒメクロマメノキの探索・収集. *植探報.* 27:41-45.
- 伊藤祐司・菅原保英. 2006. 屋久島におけるブルーベリー近縁種アクシバモドキの探索・収集. *植探報.* 22:33-35.
- 伊藤祐司・菅原保英. 2007. 愛知県及び広島県におけるブルーベリー近縁種ナツハゼ類 2 種の探索・収集. *植探報.* 23:63:67.
- 伊藤祐司・菅原保英. 2008a. 富山県立山におけるブルーベリー近縁種マルバウスゴの探索・収集. *植探報.* 24:73-77.
- 伊藤祐司・菅原保英. 2008b. 北海道根室市におけるブルーベリー近縁種ツルコケモモ及びクロマメノキの探索・収集. *植探報.* 24:79-83.
- 伊藤祐司・菅原保英. 2009a. 北海道根室市におけるブルーベリー近縁種ヒメツルコケモモの探索・収集. *植探報.* 25:45-51.
- 伊藤祐司・菅原保英. 2009b. 小笠原諸島父島におけるブルーベリー

- 近縁種ムニンシャシャンボの探索・収集. 植探報. 25:53-59.
- 伊藤祐司・菅原保英. 2010. 沖縄本島および奄美大島におけるブルーベリー近縁種ギーマの探索・収集. 植探報. 26:52-57.
- 岩垣駿夫・石川駿二. 1984. ブルーベリーの栽培. p. 234. 誠文堂新光社. 東京.
- Iwagaki, H., T. Tamada, S. Ishikawa and H. Koike. 1977. The present status of blueberry work and wild *Vaccinium* species in Japan. Acta Hortic. 61:331-334.
- Johnston, S.A. and R.E. Hanneman. 1980. Support of the Endosperm Balance Number hypothesis utilizing some tuber-bearing *Solanum* species. Amer. Potato J. 57:7-14.
- Jones, K.H. and J.A. Senft. 1985. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. J. Histochem. Cytochem. 33:77-79.
- Kalt, W., C.F. Forney, A. Martin and R.L. Prior. 1999. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. J. Agric. Food Chem. 47:4638-4644.
- 苅住 昇. 1979. 樹木根系図説. p. 993. 誠文堂新光社. 東京.
- 片倉芳雄・廣田知子. 2003. ラビットアイブルーベリーの生育および N, P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Al の吸収に及ぼす土壌 pH の影響. 恵泉女学園園芸短期大学研究紀要. 34:1-6.
- Katsube, N., K. Iwashita, T. Tsushida, K. Yamaki and M. Kobori. 2003. Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. J. Agric. Food Chem. 51:68-75.
- Kermani, M.J., V. Sarasan, A.V. Roberts, K. Yokoya, J. Wentworth and

- V.K. Sieber. 2003. Oryzalin-induced chromosome doubling in *Rosa* and its effect on plant morphology and pollen viability. *Theor. Appl. Genet.* 107:1195-1200.
- Koca, I. and B. Karadeniz. 2009. Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea Region of Turkey. *Sci. Hortic.* 121:447-450.
- 小松春喜・森田恭代・辻 雅水・具志堅綾・小野正輝・井越敬司・小林弘昌・伊藤保之・鹿毛哲朗・吉岡克則・國武久登. 2003. クロマメノキとハイブッシュブルーベリーの種間雑種の育成. *園学雑.* 72(別 2):355.
- 小松春喜・大石 寛・桂川明広・山崎裕美・小野正輝・増岡智加子・鹿毛哲朗・吉岡克則・國武久登. 2006. クロマメノキとハイブッシュブルーベリー‘ブルークropp’との種間雑種の果実特性. *園学雑.* 75(別 2):494.
- Korcak, R.F. 1986. Adaptation of blueberry species to various soil types: I. Growth and initial fruiting. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 111:816-821.
- Korcak, R.F. 1989. Variation in nutrient requirements of blueberries and other calcifuges. *HortScience* 24:573-578.
- Korcak, R.F., G.J. Galletta and A.D. Draper. 1982. Response of blueberry seedlings to a range of soil types. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 107:1153-1160.
- Kraft, T.F.B., B.M. Schmidt, G.G. Yousef, C.T.G. Knight, M. Cuendet, Y.H. Kang, J.M. Pezzuto, D.S. Seigler and M.A. Lila. 2005. Chemopreventive potential of wild lowbush blueberry fruits in

- multiple stages of carcinogenesis. *J. Food Sci.* 70:159-166.
- Krebs, S.L. and J.F. Hancock. 1988. The consequences of inbreeding on fertility in *Vaccinium corymbosum* L.. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 113:914-918.
- 國武久登・津田浩利・高木良心・大野礼成・黒木義一・吉岡克則・鹿毛哲郎・伊藤俊明・小松春喜. 2006. 北部ハイブッシュブルーベリーの暖地栽培のためのスノキ属野生種シャシャンボの台木としての可能性. *園学研.* 5:105-110.
- 串間俊文. 1986. 薩摩半島, 屋久島および沖縄本島に自生する *Vaccinium* 属植物の探索. *鹿児島大農報.* 11:19-29.
- Lee, J. and R.E. Wrolstad. 2004. Extraction of anthocyanins and polyphenolics from blueberry processing waste. *J. Food Sci.* 69:564-573.
- Li, Y., G. Tanner and P. Larkin. 1996. The DMACA-HCl protocol and the threshold proanthocyanidin content for bloat safety in forage legumes. *J. Agric. Food Chem.* 70:89-101.
- Liu, D., J. Colina-Ibarra, A. Kakuda and S.J. Hue. 2008. The scavenging capacity and synergistic effects of lycopene, vitamin E, vitamin C and β -carotene mixtures on the DPPH free radical. *LWT-Food Sci. Technol.* 41:1344-1349.
- 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. 1991. Fertile derivatives from sparkleberry \times blueberry crosses. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116:899-902.

- Lyrene, P.M. 1997. Value of various taxa in breeding tetraploid blueberries in Florida. *Euphytica* 94:15-22
- Lyrene, P.M. 2011. First report of *Vaccinium arboreum* hybrids with cultivated highbush blueberry. *HortScience* 46:563-566.
- Lyrene, P.M. and J.R. Ballington. 1986. Wide hybridization in *Vaccinium*. *HortScience* 21:52-57.
- Lyrene, P.M. and J.W. Olmstead. 2012. The use of inter-sectional hybrids in blueberry breeding. *Intl. J. Fruit Sci.* 12:269-275.
- Lyrene, P.M. and J.L. Perry. 1982. Production and selection of blueberry polyploids in vitro. *J. Hered.* 73:377-378.
- Lyrene, P.M., N. Vorsa and J.R. Ballington. 2003. Polyploidy and sexual polyploidization in the genus *Vaccinium*. *Euphytica* 133:27-36.
- Määttä-Riihinen, K.R., A. Kamal-Eldin, P.H. Mattila, A.M. Gonzalez-Paramas and A.R. Torronen. 2004. Distribution and contents of phenolic compounds in eighteen Scandinavian berry species. *J. Agric. Food Chem.* 52:4477-4486.
- Määttä-Riihinen, K.R., M.P. Kahkonen, A.R. Torronen and I.M. Heinonen. 2005. Catechins and proanthocyanidins in berries of *Vaccinium* species and their antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 53:8485-8491.
- Mainland, C.M. 1998. Frederick Coville's pioneering contributions to blueberry culture and breeding. Proceedings of the North American Blueberry Workers Conference, Wilmington, DC.
- Meiners, J., M. Schwab and I. Szankowski. 2007. Efficient *in vitro*

- regeneration systems for *Vaccinium* species. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 89:169-176.
- Miller, S., P. Alspach, J. Scalzo and J. Meekings. 2011. Pollination of 'Hortblue Petite' blueberry: Evidence of metaxenia in a new ornamental home-garden cultivar. *HortScience* 46:1468-1471.
- Miyashita, C., S. Ishikawa and M. Mii. 2009. *In vitro* induction of the amphiploid in interspecific hybrid of blueberry (*Vaccinium corymbosum* × *Vaccinium ashei*) with colchicine treatment. *Sci. Hortic.* 122:375-379.
- Moore, T. and D. Haig. 1991. Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. *Trends in Genetics* 7:45-49.
- Moore, J.N., D.H. Scott and H. Dermen. 1964. Development of a decaploid blueberry by colchicine treatment. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 84:274-279.
- Muraki, I., F. Imamura, J.E. Manson, F.B. Hu, W.C. Willett, R.M. van Dam and Q. Sun. 2013. Fruit consumption and risk of type 2 diabetes: results from three prospective longitudinal cohort studies. *British Medical Journal.* 347.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Nandakumar, V., T. Singh and S. Katiyar. 2008. Multi-targeted prevention and therapy of cancer by proanthocyanidins. *Cancer Lett.* 269:378-387.
- Neto, C.C. 2007. Cranberry and blueberry: Evidence for protective

- effects against cancer and vascular diseases. *Mol. Nutr. Food Res.* 51:652-664.
- Nishiyama, I. and T. Yabuno. 1978. Causal relationships between the polar nuclei in double fertilization and interspecific cross-incompatibility in *Avena*. *Cytologia* 43:453-466.
- 糠谷綱希・太田智宏・安田喜一・八幡昌紀・國武久登・小松春喜・新居直祐・向井啓雄・原田 久・高木敏彦. 2011. ニンポウキンカン珠心胚へのコルヒチン処理によって得た倍数体の特性とそれらの三倍体育種への利用. *園学研.* 10:1-8.
- 小川一紀. 2013. 日本人の健康と果物接種の意義. p. 197-206. 最新農業技術 果樹 vol.6. 農文協. 東京.
- 大黒俊哉・武内和彦・井手久登・吉田直隆・今川俊明・梶浦一郎. 1989. 草津白根火山における森林破壊が野生果樹クロマメノキ自生地の分布に及ぼす影響について. *造園雑誌.* 52:245-254.
- Ollitrault, P., D. Dambier, F. Luro and C. Duperray. 1994. Nuclear genome size variations in *Citrus*. *Fruit* 49:390-393.
- O'Neill, S.D. 1997. Pollination regulation of flower development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:547-574.
- 大西孝幸・木下 哲. 2010. イネ胚乳の初期発生. *Plant Morphology* 22:15-22.
- Peng, S., H.R. Dai Li, X. Yang, L. Yunfei, Y. Cunquan, S. Yan and L. Yun. 2012. Flowering characteristics and pollination and mating patterns of *Robinia pseudoacacia*. *J. Northeast Forestry Univ.* 40:6-11.
- Perry, J.L. and P.M. Lyrene. 1984. *In vitro* induction of tetraploidy in

- Vaccinium darrowi*, *V. elliottii*, and *V. darrowi* × *V. elliottii* with colchicine treatment. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 109:4-6.
- Prior, R.L. and J. Joseph. 2005. Berries and fruits in cancer chemoprevention. p. 465-479. In: D. Bagchi and H.G. Preuss (eds). *Phytopharmaceuticals in Cancer Chemoprevention*. CRC Press, Florida.
- 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.
- Prior, R.L., X. Wu, L. Gu, T.J. Hager, A. Hager and L.R. Howard. 2008. Whole berries versus berry anthocyanins: interactions with dietary fat levels in the C57BL/6J mouse model of obesity. J. Agric. Food Chem. 56:647-653.
- Rendeiro, C., D. Vauzour, R.J. Kean, L.T. Butler, M. Rattray, J.P. Spencer and C.M. Williams. 2012. Blueberry supplementation induces spatial memory improvements and region-specific regulation of hippocampal BDNF mRNA expression in young rats. *Psychopharmacology* 223:319-330.
- Retamales, J.B. and J.F. Hancock. 2012. *Blueberries*. p. 1-307. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Ribera, A.E., M. Reyes-Diaz, M. Alberdi, G.E. Zuñiga and M.L. Mora. 2010. Antioxidant compounds in skin and pulp of fruit change among genotypes and maturity stages in highbush blueberry

- (*Vaccinium corymbosum* L.) growing in southern Chile. J. Soil Sci. Plant Nutr. 10:509-536.
- Riihinen, K., L. Jaakola, S. Karenlampi and A. Hohtola. 2008. Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and 'northblue' blueberry (*Vaccinium corymbosum* × *V. angustifolium*). Food Chem. 110:156-160.
- Rousi, A. 1963. Hybridization between *Vaccinium uliginosum* and cultivated blueberry. Ann. Agr. Fenniae 2:12-18.
- Rousi, A. 1966. The use of north-European *Vaccinium* species in blueberry breeding. Acta Agr. Scandinavica Suppl. 16:50-54.
- Rousi, A. 1967. Cytological observations on some species and hybrids of *Vaccinium*. Zuchter/Gen. Breed. Res. 36:352-359.
- Rowland, L.J., J.F. Hancock and N.V. Bassil. 2011. Blueberry. p. 1-40. In: K.M. Folta and C. Kole (eds). Genetics, Genomics and Breeding of Berries. Science Publisher, Enfield, USA.
- Saura-Calixto, F. and I. Goñi. 2009. Definition of the Mediterranean diet based on bioactive compounds. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 49:145-152.
- Saura-Calixto, F., J. Pérez-Jiménez and I. Goñi. 2010. Dietary fiber and associated antioxidants in fruit and vegetables. p. 223-234. In: L.A. de La Rosa, E. Álvarez-Parilla, G.A. González-Aguilar (eds). Fruit and Vegetable Phytochemicals. Wiley-Blackwell, Iowa, USA.
- Scalzo, J., A. Politi, N. Pellegrini, B. Mezzetti and M. Battino. 2005. Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. Nutrition 21:207-213.

- Schmidt, B.M., J.W. Erdman Jr. and M.A. Lila. 2006. Differential effects of blueberry proanthocyanidins on androgen sensitive and insensitive human prostate cancer cell lines. *Cancer Lett.* 231:240-246.
- Schroeter, H., C. Boyd, J.P.E. Spencer, R.J. Williams, E. Cadenas and C. Rice-Evans. 2002. MAPK signaling in neurodegeneration: Influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiol. Aging* 23:861-880.
- Seeram, N.P., L.S. Adams, Y. Zhang, R. Lee, D. Sand, H.S. Scheuller and D. Heber. 2006. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.* 54:9329-9339.
- Sharpe, R.H. 1953. Horticultural development of Florida blueberries. *Proc. Florida State Hort. Soc.* 66:188-190.
- Sharpe, R.H. and G. M. Darrow. 1959. Breeding blueberries for the Florida climate. *Proc. Florida State Hort. Soc.* 72:308-311.
- Sharpe, R.H. and W.B. Sherman. 1971. Breeding blueberries for low chilling requirement. *HortScience* 6:145-147.
- 執行みさと・福島光志・國武久登・小松春喜. 2010. 我が国自生スノキ属野生種の核 DNA 含量,葉,花および果実の形態的特性並びに果実品質の比較. *園学研.* 9 別(2):396.
- Singleton, U.L. and J. Rossi. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. *Am. J. Enol. Vitic.* 16:144.

- Stamps, R.H. and M.R. Evans. 1997. Growth of *Dieffenbachia maculata* 'Camille' in growing media containing sphagnum peat or coconut coir dust. HortScience 32:844-847.
- Steinmetz, K.A. and J.D. Potter. 1991. Vegetables, fruits and cancer. II. Mechanisms. Cancer Causes Control 2:427-442.
- 須田郁夫. 2000. 抗酸化機能①分光学的抗酸化機能評価. p. 218-223. 篠原和毅・鈴木建夫・上野川修一編著. 食品機能研究法. 光琳. 東京.
- 杉山信男・田中 勲・高溝 正. 1989. ブルーベリーのクロロシス発生に及ぼす培養液の pH 並びに窒素形態の影響. 園学雑. 58:63-67.
- 諏訪理恵子・矢吹隆夫. 2002. ナツハゼの実生繁殖法. 東北農業研究. 55:265-266.
- Suzuki, A., A. Miura and K. Aoba. 1999. Observation on the viability of root apex cells treated with different pH and aluminum in highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) and Maruba kaido (*Malus prunifolia* Borkh. var. Ringo) cultured *in vitro*. J. Japan. Soc. Hor. Sci. 68:932-936.
- Tamada, T. 1996. Blueberry culture and research in Japan. J. Small Fruit Viticult. 3:227-241.
- Tetsumura, T., Y. Matsumoto, M. Sato, C. Honsho, K. Yamashita, H. Komatsu, Y. Sugimoto and H. Kunitake. 2008. Evaluation of basal media for micropropagation of four highbush blueberry cultivars. Sci. Hortic. 119:72-74.
- Tetsumura, T., Y. Kajiwara, C. Honsho, M. Sato-Yamauchi, Y. Sugimoto and H. Kunitake. 2012. Effective micropropagation of rabbiteye

- blueberries for leaf tea production. *Environ. Control Biol.* 50:289-296.
- 津田 浩利. 2007. スノキ属植物における倍数体の育成と種間交雑に関する研究. 宮崎大学大学院農学研究科修士論文.
- 津田 浩利・小島 祥子・大坪 早貴・小松 春喜・國武 久登. ブルーベリー近縁種ナツハゼとアラゲナツハゼにおける果実の成熟特性と品質評価. 園学研. 印刷中
- Tsuda, H., H. Kunitake, M. Yamasaki, H. Komatsu and K. Yoshioka. 2013. Production of intersectional hybrids between colchicine-induced tetraploid shashanbo (*Vaccinium bracteatum*) and highbush blueberry 'Spartan'. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 138:317-324.
- Tsukaya, H., T. Fukuda and J. Yokoyama. 2003. Hybridization and introgression between *Callicarpa Japonica* and *C. mollis* (Verbenaceae) in central Japan, as inferred from nuclear and chloroplast DNA sequence. *Mol. Ecol.* 12:3003-3011.
- 内野 憲. 2005. ブルーベリーを加害するオウトウショウジョウバエの千葉県における分布および発生消長. 関東東山病害虫研究会報. 52:95-97.
- 浦山 久. 2009. 熱帯地域におけるココナツコイアを利用した作物の養液栽培および耕地への還元利用に関する研究. 筑波大博論.
- Ureshino, K. 2008. Study of cross incompatibility between evergreen and deciduous azaleas. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 77:1-6.
- 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.
- Väinölä, A. 2000. Polyploidization and early screening of *Rhododendron* hybrids. Euphytica 112:239-244.
- van Duren, M., R. Morpurgo, J. Dolezel and R. Afra. 1996. Induction and verification of autotetraploids in diploid banana (*Musa acuminata*) by *in vitro* techniques. Euphytica 88:25-34.
- van Tuyl, J.M., B. Meijer and M.P. van Dien. 1992. The use of oryzalin as an alternative for colchicine in *in vitro* chromosome doubling of *Lilium* and *Nerine*. Acta Hort. 325:625-630.
- Wang, S.Y., M.J. Camp and M.K. Ehlenfeldt. 2012a. Antioxidant capacity and α -glucosidase inhibitory activity in peel and flesh of blueberry (*Vaccinium* spp.) cultivars. Food Chem. 132:1759-1768.
- Wang, S.Y., H. Chen, M.J. Camp and M.K. Ehlenfeldt. 2012b. Flavonoid constituents and their contribution to antioxidant activity in cultivars and hybrids of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei* Reade). Food Chem. 132:855-864.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Lival, J.M. Rafalski and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids Res. 18:6531-6535.
- Wolfe, D., C.K. Chin and P. Eck. 1986. Relationship of the pH of medium to growth of 'Bluecrop' highbush blueberry *in vitro*. HortScience 21:296-298.
- Wolfe, D.E., P. Eck and C. Chin. 1983. Evaluation of seven media for

- micropropagation of highbush blueberry. HortScience 18:703-705.
- Yahata, M., S. Harusaki, H. Komatsu, K. Takami, H. Kunitake, T. Yabuya, K. Yamashita and P. Toolapong. 2005a. Morphological characterization and molecular verification of a fertile haploid pummelo (*Citrus grandis* Osbeck). J. Amer. Soc. Hort. Sci. 130:34-40.
- 八幡昌紀・柏原夕希子・黒木宏憲・國武久登・小松春喜. 2004. ニンポウキンカン種子へのコルヒチンおよびオリザリン処理が四倍体植物誘導に及ぼす影響. 園学研. 3:11-16.
- Yahata, M., H. Kunitake, T. Yabuya, K. Yamashita, Y. Kashihara and H. Komatsu. 2005b. Production of a doubled haploid from a haploid pummelo using colchicine treatment of axillary shoot buds. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 130:899-903.
- Yamasaki, M., A. Kawabe, K. Nishimoto, H. Madhyastha, Y. Sakakibara, M. Suiko, T. Okamoto, T. Suda, K. Uehira and K. Nishiyama. 2009. Dihydro-alpha-lipoic acid has more potent cytotoxicity than alpha-lipoic acid. In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. 45:275-280.
- 山内（佐藤）真希子・津田浩利・荒木啓輔・内田飛香・安田喜一・鉄村琢哉・小松春喜・國武久登. 2012. 我が国自生のスノキ属植物とブルーベリー栽培品種における植物組織培養と試験管外発根を利用したクローン増殖. 園学研. 11:13-19.
- 山崎 敬. 1989. ツツジ科. p. 122-156. 佐竹義輔・原 寛・亘理俊次・富成忠夫 編. 日本の野生植物 木本Ⅱ. 平凡社. 東京.
- Yang, T.W., Y.A. Yang and Z.G. Xiong. 2000. Paternal inheritance of chloroplast DNA in the genus *Larrea* (Zygophyllaceae). Amer. J.

Bot. 87:1452-1458.

- You, Q., B. Wang, F. Chen, Z. Huang, X. Wang and P.G. Luo. 2011. Comparison of anthocyanins and phenolics in organically and conventionally grown blueberries in selected cultivars. *Food Chem.* 125:201-208.
- Zhang, J., O.P. Lazarenko, M.L. Blackburn, K. Shankar, T.M. Badger, M.J. Ronis and J.R. Chen. 2011. Feeding blueberry diets in early life prevent senescence of osteoblasts and bone loss in ovariectomized adult female rats. *PloS one*, 6:e24486.
- Zheng, W. and S.Y. Wang. 2003. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries and lingonberries. *J. Agric. Food Chem.* 51:502-509.