

(原著論文)

ブルーベリーおよび日本在来野生種を含めた *Vaccinium* 属の 遺伝的類縁関係の解析と種間雑種の育種的利用

宮下千枝子

東京都農林総合研究センター

日本にはブルーベリーと近縁の *Vaccinium* 属野生種が 19 種存在し、日本の環境条件に適合する新しいブルーベリー品種を開発するための育種素材として有望である。そこで本論文では、*Vaccinium* 属種の遺伝的類縁関係、倍数性、種間雑種に関して基礎的研究を行い、育種上有用な以下の知見を得た。(1) ブルーベリーの SSR マーカーを用いて日本在来野生種を含めた *Vaccinium* 属 22 種について多型解析を行った結果、SSR マーカーが広範な *Vaccinium* 属種の多型解析に有効であり、類縁関係や倍数性の評価に有用であることがわかった。(2) *Vaccinium* 属 8 種類間で総当たりの正逆交配を行い、交雑能力を評価した。その結果、ブルーベリーと日本の 2 倍体野生種のように節や倍数性が異なる種間では雑種作出が著しく困難である一方で、種間雑種 TO-303 のように節や倍数性を超えて広範な交雑能力を有する素材があることを明らかにした。(3) 倍数性の相違による交雑不稔や雑種の低稔性の問題を解決するため、*Vaccinium* 属植物の倍数体を効率的に作出するコルヒチン処理法を確立した。以上の結果をもとに、日本の 2 倍体野生種とブルーベリーとの種間交雑を成功させるための 3 つの方法論を提案した。

キーワード : ブルーベリー育種, 日本在来野生種, *Vaccinium* 属種, DNA 解析, 種間雑種

東京都農林総合研究センター研究報告 12: 1-58, 2017

目 次

第 1 章 序論	2.3.1 多型解析
	2.3.2 樹形図
	2.3.3 倍数性レベルの評価
	2.4 考察
第 2 章 <i>Vaccinium</i> 属種の遺伝的類縁関係の評価	第 3 章 <i>Vaccinium</i> 属種の交雑能力の評価
2.1 緒言	3.1 緒言
2.2 材料および方法	3.2 材料および方法
2.2.1 供試材料	3.2.1 供試材料
2.2.2 SSR マーカーによる多型解析	3.2.2 正逆交配
2.2.3 樹形図の作成	3.2.3 倍数性レベルおよび雑種性の評価
2.2.4 倍数性レベルの評価	3.2.4 交雑能力の評価
2.3 結果	

著者連絡先 E-mail c-miyashita@tdfaff.com
東京農工大学大学院連合農学研究科学学位審査論文

3.2.5 雑種の外部形態等の評価	第5章 総合考察
3.2.6 雑種の稔性の評価	
3.3 結果	摘要
3.3.1 正逆交配の結果	
3.3.2 交雑実生の倍数性レベルおよび雑種性の評価	謝辞
3.3.3 交雑能力の評価	
3.3.4 雑種の外部形態等の評価	引用文献
3.3.5 雑種の稔性の評価	
3.4 考察	Summary

第4章 倍数体の作出と評価

第1章 序論

4.1 緒言
4.2 材料および方法
4.2.1 2倍体野生種からの倍数体作出
4.2.2 倍数体の外部形態等の評価
4.2.3 倍数体の稔性の評価
4.3 結果
4.3.1 2倍体野生種からの倍数体作出
4.3.2 倍数体の外部形態等の評価
4.3.3 倍数体の稔性の評価
4.4 考察

ブルーベリーは *Vaccinium* 属 *Cyanococcus* 節に属する低木果樹の総称であり、主な栽培種にはハイブッシュブルーベリー (*V. corymbosum*; 本章では **HB** と略す) とラビットアイブルーベリー (*V. virgatum*; 本章では **RB** と略す) の2種がある(表1-1, 図版1-1)。**HB** は果実品質が優れ、早生で耐寒性が強いが、暑さや乾燥に弱く、土壌適応性が低い。一方、**RB** は、晩生で温暖地適応性があり、**HB** に比べて果実品質はやや低いものの、耐乾性や土壌適応性は優れる。

表1-1 ブルーベリー栽培種 (*Cyanococcus* 節) の主な特性^a

種類	種	樹				果実			根・土壌条件			
		樹形	樹勢	低温要求量	耐寒性	大きさ	収量	成熟期	根群	水分	耐乾性	好適なpH範囲
(ノーザン)ハイブッシュブルーベリー	<i>V. corymbosum</i>	中型	中	多	強	大	多	6月上旬 ~7月下旬	大	最も好む	弱	4.3- 4.8
サザンハイブッシュブルーベリー	<i>V. corymbosum</i> , <i>V. darrowi</i> 等の 種間雑種	小型	弱	少	弱	中	中~ 少	6月上旬 ~7月中旬	中	好む	中	4.3- 4.8
ラビットアイブルーベリー	<i>V. virgatum</i>	大型	強	中	弱	大~ 中	極多	7月上旬 ~9月上旬	大	好む	強	4.3- 5.3

a) 玉田(2008)の表をもとに作成

ブルーベリーの果実はアントシアニンを豊富に含み、高い抗酸化能や視力改善機能、メタボリックシンドロームの予防効果など多くの機能性を有することが報告されている (Hou, 2003; 津田ら, 2009)。このことから、ブルーベリーは近年、日本でも注目され、消費、生産ともに増加している (玉田, 2008)。特に HB は、大果で良食味であるため消費者の人气が高く、日本でも栽培を希望する生産者が多い。

HB の育種は主に米国で行われ、その歴史はまだ 100 年余りと短い。日本で経済栽培される品種の多くは米国等の海外で育成されたものであるが、いずれの HB 品種も pH4.5 前後の強酸性土壌を好み、暑さや乾燥に弱いなど HB 特有の性質を持つ (石川・小池, 2006)。したがって、土壌 pH の高い園地を HB の適正範囲にまで矯正するには、硫黄華やピートモスなどの資材を大量に投入する必要がある。また、関東以南の平地で HB を栽培すると暑さや乾燥により生育不良となりやすく、寒冷地での栽培に比べて収量性は低くなる。加えて、HB の収穫期は 6~7 月で梅雨期に重なるため、果実品質が低下するという問題もある。梅雨期の降雨や日照不足、病虫害発生の影響をクリアし、安定して高品質生産を行うのは容易ではない。國武ら (2006) は温暖地での HB 栽培技術の開発を目指し、日本の温暖地に自生する野生種 *V. bracteatum* (シャシャンボ) を台木に用いた HB の接ぎ木栽培が有望であると報告している。しかし、ブルーベリーの樹形はブッシュ状であり、接ぎ木栽培では主軸枝を更新するたびに接ぎ木作業が必要となり、多大な労力を要する。温暖地での安定かつ省力的な HB 栽培を実現するためには、温暖地適応性を有する新品種を開発することが望ましいと考える。日本の HB 育種は、群馬県の新品種育成 (堀込ら, 1999; 2000) を皮切りに、近年多くの品種が開発・発表されるようになったが、そのほとんどは HB の種内交雑または自然交雑に由来する。

ブルーベリーの育種において、種間交雑は最も重要な手法である (Lyrene and Ballington, 1986)。米国ではブルーベリー種と米国在来野生種との間で雑種作出を積極的に行い、様々な栽培環境に適合する品種群を開発してきた。特に、米国南部に自生する常緑性野生種 *V. darrowi* と HB との種間雑種作出は、米国における温暖地向け HB 品種育成の端緒となった重要な事例である (Lyrene 1997; Ballington, 2009)。低温要求量が少なく耐乾性を有する *V. darrowi* と、HB を中心とするブルーベリー種との交雑により、サザンハイブッシュブルーベリー (本章では SHB と略す) という新たな品種群が育成され (表 1-1)、フロリダ州など米国南部での HB の経済栽培が可能となった。SHB については、日本でも近年多くの品種が導入され、

温暖な地域を中心に試作 (車ら, 2009) や生産に供されている。しかし、冬期も温暖なフロリダ州などと比べて、関東以南の地域は冬・春季の気温が低いため、低温要求量が少ないという SHB の性質は、必ずしも日本の温暖地に適合しているとは言えない。また、収穫期はやはり梅雨期と重なるため、従来の HB 品種と同様の課題が残る。

一方、日本にはブルーベリーと近縁の *Vaccinium* 属野生種が 19 種あり (山崎, 1989; Yamazaki, 1993)、分布域も特性も多様である (表 1-2, 図版 1-1)。*V. uliginosum* (クロマメノキ)、*V. vitis-idaea* (コケモモ)、*V. oldhamii* (ナツハゼ)、*V. bracteatum*、*V. wrightii* (ギーマ) などは、各地域の人々や趣味家によってジュースや砂糖漬け、果実酒などに加工・利用されてきたが、栽培化には至らなかった (玉田, 2008)。小笠原諸島固有種の *V. boninense* (ムニンシャシャンボ) や沖縄等に自生する *V. wrightii* は、ともに亜熱帯地域の乾性低木林や明るい林縁などに自生することから (伊藤・菅原, 2009; 2010)、高い耐暑性や耐乾性を有すると考えられる。関東以南に自生する *V. bracteatum* は温暖地に適合し、土壌適応性が広い (Luby et al., 1991)。また、これらの野生種はいずれも HB に比べて晩生であることから (表 3-1)、関東以南の温暖な気候に適合し、梅雨以降に収穫可能な日本型 SHB を開発するための育種素材として有望である。このほか、*V. oldhamii* は、果実のアントシアニン含量がブルーベリーよりも多く、抗酸化能が高いことから (津田ら, 2014)、健康機能性をさらに向上させた新しいブルーベリーを開発するための育種素材として有望である。しかし、ブルーベリーの交雑育種に日本在来野生種を利用する試みはまだ少なく、種間雑種の作出は数例に留まる (執行ら, 2014; Tsuda et al., 2013; Ehlenfeldt and Ballington, 2012)。したがって、日本にはブルーベリーに近縁の *Vaccinium* 属野生種が多数あるにも関わらず、これら育種素材が活用できていないのが現状である。

種間交雑における親和性は一般に類縁関係に近いほど高いため、DNA マーカーを用いて、*Vaccinium* 属種間の遺伝的類縁関係を推定することは、育種上の重要な知見となる。しかし、これまで日本在来野生種では、DNA レベルの解析があまり行われてこなかったため、得られている知見はごく一部の種に留まっている (Hirai et al., 2010, Tsutsumi, 2011)。HB で開発された SSR (Simple Sequence Repeat) マーカーは、複数の近縁種の解析でも活用されていることから (Boches et al., 2005; 櫛川ら, 2006; Bian et al., 2014; Liu et al., 2014)、日本の野生種の評価にも利用できる可能性がある。そこで、第 2 章では、ブルーベリーと日本の野生種を含めた広範な *Vaccinium* 属種について SSR 多型解析を行い、遺伝的類縁関係を評

表1-2 ブルーベリーの主要な栽培種および日本在来の近縁野生種 (*Vaccinium* spp.)^a

節・種	和名・流通名	倍数性 レベル	分布	生態	樹高	果実	
						色	直径 (mm)
ブルーベリー栽培種							
<i>Cyanococcus</i>	<i>V. corymbosum</i>	ハイブッシュブルーベリー	4x	カナダ～米国	落葉	1-5m	有 (生食)
	<i>V. virgatum</i>	ラビットアイブルーベリー	6x	米国	落葉	1.5-6m	有 (生食)
	<i>V. angustifolium</i>	ローブッシュブルーベリー	4x	カナダ～米国	落葉	10-20cm	有 (生食)
日本在来野生種							
<i>Myrtillus</i>	<i>V. yatabei</i>	ヒメウスノキ		中部以北の亜高山帯 (固有種)	落葉	10-30cm	赤 約8
	<i>V. ovalifolium</i>	クロウスゴ		北海道～中部, 北半球の寒冷地	落葉	0.3-1.2m	黒紫 8-10
	<i>V. shikokianum</i>	マルハバウスゴ		本州の高山帯 (固有種)	落葉	0.2-1m	黒紫 8-10
<i>Hemimyrtilus</i>	<i>V. hirtum</i>	ウスノキ		北海道～九州 (固有種)	落葉	0.5-1m	赤 約8
	<i>V. smallii</i>	オオバスノキ		サハリン, 北海道～中部	落葉	1m	紫黒 6-8
	<i>V. yakushimense</i>	アキシバモトキ		屋久島 (固有種)	落葉	30-70cm	黒紫 約6-9
<i>Bracteata</i>	<i>V. boninense</i>	ムニンシヤンボ		小笠原 (固有種)	常緑	1m	黒 約6
	<i>V. bracteatum</i>	シヤンボ		関東～九州, 台湾, 朝鮮半島, 中国	常緑	2-5m	黒紫 5-6
	<i>V. wrightii</i>	ギョーマ		九州～沖縄, 台湾	常緑	1-3m	黒 5-7
<i>Ciliata</i>	<i>V. oldhamii</i>	ナツハゼ		北海道～九州, 朝鮮半島, 中国	落葉	1-4m	黒紫 6-8
	<i>V. ciliatum</i>	アラゲナツハゼ		本州～九州 (固有種)	落葉	2m	黒 5-7
	<i>V. sieboldii</i>	ホナガナツハゼ		静岡以南の本州 (固有種)	落葉	1-2m	黒 5-6
<i>Conchophyllum</i>	<i>V. emarginatum</i>	ヤドリコケモモ		沖縄～台湾	常緑	20-60cm	紫黒 約7
<i>Oxycoccoides</i>	<i>V. japonicum</i>	アキシバ		北海道～九州, 朝鮮半島	落葉	0.3-1m	赤 約5-7
<i>Oxycoccus</i>	<i>V. microcarpum</i>	ヒメツルコケモモ		北海道～長野, 北半球の寒冷地	常緑	ほふく性	赤 6-7
	<i>V. oxycoccus</i>	ツルコケモモ		北海道～中部, 北半球の寒冷地	常緑	ほふく性	赤 約10
<i>Praestantia</i>	<i>V. praestans</i>	イワンツジ		北海道～本州, 北半球の寒冷地	落葉	5-15cm	鮮赤 約10
<i>Vitis-idaea</i>	<i>V. vitis-idaea</i>	コケモモ	2x	北海道～九州, 北半球の寒冷地	常緑	10-15cm	紅 4-10
<i>Vaccinium</i>	<i>V. uliginosum</i>	クロマメノキ	2x, 4x, 6x	北海道～中部, 北半球の寒冷地	落葉	30-80cm	紫黒 6-7

a) USDA GRIN Taxonomy (<http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/index.pl>), 日本植物誌データベース(<http://foj.c.u-tokyo.ac.jp/gbif/>), 牧野 (1989), 佐竹ら (1999), 林ら (1987), 玉田 (2008) をもとに作成した。 b) 既報のデータより。

価した。

また、種間交雑の成否に影響する要因として、倍数性レベルもまた重要な要素の一つである。*Vaccinium* 属の種間交雑では一般に、同倍数体間では雑種が容易に得られるが異倍数体間では困難とされる (Galletta, 1975)。ブルーベリー種の HB は 4 倍体 ($2n=4x=48$)、RB は 6 倍体 ($2n=6x=72$) であり、*Vaccinium* 属では他にも倍数性種が多くある。その一方で、日本の野生種の多くは、染色体数や倍数性レベルに関する知見がほとんどない。フローサイトメトリーによる倍数性レベルの推定は、ブルーベリーでは容易であることから (Costich et al., 1993; Miyashita et al., 2009)、野生種にも適用できると考えられる。また、いくつかの作物では、SSR 多型解析により倍数性レベルを推定する試みが報告されている (Besnard et al., 2008; Yagi et al., 2009)。そこで、第 2 章では、フローサイトメトリーと SSR 多型解析を用いて、野生種の倍数性レベルの推定を行った。

Vaccinium 属種間の交雑能力については、ブルーベリー種間では一定の知見が得られている。すなわち、HB と RB は交雑が可能であり、その種間雑種は稔性の低い 5 倍体となるものの、両親種との戻し交雑は可能である (Vorsa et al., 1987; Lavery and Vorsa, 1991)。また、5 倍体雑種からは RB と同程度の高 pH 土壌適応性を有する個体を選抜できることが報告されている (宮下・石川, 2008)。これらのことから、ブルーベリーの 5 倍体雑種を用いた育種は、HB のもつ優れた果実品質と RB のもつ温暖地適応性や土壌適応性を兼ね備えた、日本型の SHB を開発する上で魅力的な手法といえる。ただし、これら 2 種の交雑において、正逆交配の方向性 (Galletta, 1975; Lyrene, 1988) や品種の違いが交雑能力に及ぼす影響についてはまだ明らかでないため、効率的に 5 倍体雑種を作出するためにはこの点の検討が必要である。一方、ブルーベリーと日本在来野生種との種間交雑については知見が非常に少ないのが現状であり、野生種の育種利用を進めるためにはまず、ブルーベリーと野生種の交雑能力を明らかにする必要がある。そこで第 3 章では、ブルーベリーと日本在来野生種を含めた種々の *Vaccinium* 属種を供試して総当たりの正逆交配を行い、各々の交雑能力を評価した。

さらに、上記の研究で得られた知見を育種利用するにあたり、日本在来野生種が 2 倍体でブルーベリー種との交雑が困難であった場合には、野生種を染色体倍加して倍数体を作成し、ブルーベリーとの交雑能力を高めることが必要になる。また、*Vaccinium* 属種間で目的とする雑種の作出に成功したとしても、一般的に種間雑種は低稔性が不稔になりやすく、育種素材として利用することは

困難がともなう。*V. corymbosum* は同質 4 倍体であると推測されているが (Qu et al., 1998; Lyrene et al., 2003)、*Vaccinium* 属の多くの種はゲノム構成がまだ明らかとなっていない。ブルーベリー種と近縁野生種が異なるゲノムを有する場合、得られた雑種個体の稔性回復には複二倍体化することが有効と考えられる。これらのことから、*Vaccinium* 属植物において倍数体を効率的に作出する手法を確立しておくことは重要である。倍数体を作成するためには、様々な作物で効果的な手法としてコルヒチン処理が用いられ (Notsuka et al., 2000; Gmitter and Ling, 1991; 八幡ら, 2004)、ブルーベリーでも腋芽 (Moore et al., 1964) や種子 (Miyashita et al., 2009) への処理法が報告されている。そこで第 4 章では、*Vaccinium* 属植物の倍数体を効率的に作出できるコルヒチン処理法の確立を目指した。

以上で述べたように、日本には亜熱帯地域に自生する *V. boninense* などブルーベリーに近縁の *Vaccinium* 属野生種が多数あるにも関わらず、これら育種素材が活用できていない。日本の環境条件に適合し、良食味で多収性のブルーベリー品種を開発するためには、日本在来野生種とブルーベリーの交雑親和性を評価し、それら種間雑種の育種的利用を図ることが必要である。そこで、本論文では、日本在来野生種をブルーベリー育種に利用するための基礎的な知見の獲得と育種技術の開発を目指し、*Vaccinium* 属の遺伝的類縁関係、倍数性レベルおよび種間雑種に関する研究を行った。

すなわち、第 2 章では、ブルーベリーと日本の野生種を含めた広範な *Vaccinium* 属種について SSR 多型解析を行い、遺伝的類縁関係を評価した。併せて、野生種の倍数性レベルの推定を行った。

第 3 章では、ブルーベリーと日本在来野生種を含めた種々の *Vaccinium* 属種を用いて総当たりの正逆交配を行い、各々の交雑能力を評価した。交雑実生の雑種性の判定は SSR マーカーによって行った。また、得られた種間雑種については、野生種等に由来する有用形質や稔性を調査し、新しい育種素材としての可能性を評価した。

第 4 章では、*Vaccinium* 属植物の倍数体を効率的に作出できる手法の確立を目指し、種子への *in vitro* コルヒチン処理法により日本在来野生種等の倍数体作出を試みた。さらに、作出された倍数体については外部形態や稔性等を調査し、ブルーベリーの新しい育種素材としての可能性を評価した。

以上の結果から、第 5 章では *Vaccinium* 属種間交雑の成否に関わる諸要因を解析し、種間雑種や倍数体の利用可能性について考察し、日本在来野生種を利用するためのブルーベリーの育種法 (Breeding program) を提案した。

第2章 *Vaccinium*属種の遺伝的類縁関係の評価

2.1 緒言

種間交雑における親和性は一般に類縁関係に近いほど高いため、分子マーカーを用いて *Vaccinium* 属種間の遺伝的類縁関係の評価することは重要である。日本の在来野生種については、形態的特性 (Vander Kloet and Dickinson, 1999; 1992) や花粉形態 (Sarwar et al., 2006) に基づき、多くの節・種の類縁関係の評価が行われている。一方、分子マーカーを用いた解析については、RAPD マーカー (平井ら, 2005) や SSR マーカー (Hirai et al., 2010), ITS および *matK* 領域 (Tsutsumi, 2011) を用いた解析が報告されているが、いずれも *V. ciliatum* (アラゲナツハゼ) などの絶滅危惧種とその近縁種との類縁関係の評価を主眼としており、ブルーベリーと日本在来野生種の遺伝的類縁関係を網羅的に解析した事例はない。

V. corymbosum では多くの DNA マーカーが開発されており、その EST (Expressed Sequence Tag) -PCR マーカーは、栽培品種の評価 (Rowland et al., 2003) に加えて、*Cyanococcus* 節の 2 倍体種 (Rowland et al., 2002), *V. virgatum* (Rowland et al., 2010), *V. angustifolium* (ローブッシュブルーベリー) (Bell et al., 2008) の解析にも有効であった。*V. corymbosum* の SSR マーカーは、ブルーベリー種の多様性解析や品種識別 (Boches et al., 2006; Hinrichsen et al., 2009), *Cyanococcus* 節の遺伝的多様性や集団構造の解析 (Brevis et al., 2008; Bian et al., 2014), 中国の *Vaccinium* 属野生種の解析 (Liu et al., 2014) に有効であった。また、*V. corymbosum* のゲノミックライブラリーから Genomic-SSR マーカーが開発され、日本では栽培品種の同定や一部の在来野生種の解析に用いられた (櫛川ら, 2006; 岡本ら, 2012)。これらのことから、*V. corymbosum* の SSR マーカーは日本の野生種の評価にも利用できると考えられる。

種間交雑においては、倍数性レベルも成否に関わる重要な要素の一つである。ブルーベリー種の *V. corymbosum* は 4 倍体 ($2n=4x=48$), *V. virgatum* は 6 倍体 ($2n=6x=72$) であり、*Vaccinium* 属では他にも倍数性種が多くある。一方、日本の野生種の多くは、染色体数や倍数性レベルに関する知見がほとんどない。*Vaccinium* 属の基本数は 12 であり、高次の倍数性レベルを染色体数の計測によって判定することは困難である。ブルーベリー種では、フローサイトメトリーにより倍数性レベルを容易に同定できることが報告されている (Costich et al., 1993; Miyashita et al., 2009)。

一方、SSR 解析で検出される 1 遺伝子座あたりのアリル数は、その遺伝子座が全てヘテロ接合型であった場合

にはその個体の倍数性レベルを反映する。SSR 解析により倍数性レベルを推定する試みはオリーブ (Besnard et al., 2008), カーネーション (Yagi et al., 2009) などで報告がある。したがって、多型性の高い SSR マーカーを用いれば *Vaccinium* 属種においても倍数性レベルを推定できると考えられる。

本章の目的は、これまで DNA レベルの解析がほとんど行われてこなかった日本の野生種について、*V. corymbosum* の EST および Genomic-SSR マーカーを用いて多型解析や類縁関係、倍数性レベルを評価することである。そこで、日本の野生種 15 種を含めた *Vaccinium* 属 22 種について SSR 多型解析を行い、樹形図を作成して遺伝的類縁関係の評価した。また、フローサイトメトリーおよび SSR 多型解析により倍数性レベルの推定を行った。

2.2 材料および方法

2.2.1 供試材料

Vaccinium 属の日本在来野生種 15 種、ブルーベリー 3 種 (*V. corymbosum*, *V. virgatum*, *V. angustifolium*), その他 4 種 (*V. darrowi*, *V. ovatum*, *V. macrocarpon* (クランベリー), *V. myrtilus* (ビルベリー)) を含む、合計 11 節、22 種、50 個体を供試した (表 2-1)。

2.2.2 SSR マーカーによる多型解析

未展開葉 約 100 mg から、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いてゲノム DNA を抽出した。この DNA を鋳型とし、*V. corymbosum* で開発された EST-SSR マーカー (Boches et al., 2005) 6 種類および Genomic-SSR マーカー (櫛川ら, 2006) 6 種類、合計 12 種類のプライマーペアを用いて PCR を行った (表 2-2)。各プライマーペアは、フォワードの 5' 末端を FAM または HEX で蛍光ラベルして用いた。

SSR-PCR は、1 サンプルあたり 2.5ng のゲノム DNA、各 0.2 mM の各 dNTP、1×PCR buffer、1.5 mM MgCl₂、0.25 U BIOTAQ DNA polymerase (Bioline)、0.5 μM のプライマーペアを含む 12.5 μl の反応液で行った。増幅反応は、94 °C・3 分の熱変性後、94 °C・30 秒、55~64 °C・45 秒 (表 2-2)、72 °C・1 分を 35 サイクル行い、72 °C・10 分の最終伸長反応を行った。

PCR 産物を ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて電気泳動した後、Gene Mapper software version 3.7 (Applied Biosystems) で断片長を決定した。検出された断片長の違いに基づいて、その SSR 遺伝子座のアリル数を推定し、SSR 遺伝子型の解析を行った。

表2-1 SSR解析に供試した *Vaccinium* 属種

節	種 ^a	倍数性 レベル ^b	供試 個体数	品種・個体名 ^c	和名・流通名
<i>Cyanococcus</i>	<i>V. corymbosum</i>	4x	6	Berkeley, Chandler, Earliblue, Echota, Elliott, Spartan ^z	ハイブッシュ ブルーベリー
	<i>V. virgatum</i>	6x	4	Baldwin, Brightwell, Homebell, Tifblue ^z	ラビットアイ ブルーベリー
	<i>V. angustifolium</i>	4x	1	Brunswick ^w	ローブッシュ ブルーベリー
	<i>V. darrowi</i>	2x	1	Native blue ^w	-
<i>Pycnothamnus</i>	<i>V. ovatum</i>	2x	1	ot-1 ^z	-
<i>Oxycoccus</i>	<i>V. macrocarpon</i>	2x	2	Crowly, Early Black ^w	クランベリー
<i>Myrtillus</i>	<i>V. myrtillus</i>	2x	3	my-1~3 ^y	ビルベリー
	<i>V. vatabei</i>	-	1	yt-1 ^u	ヒメウスノキ
	<i>V. ovalifolium</i>	-	2	ov-1~2 ^v	クロウソゴ
	<i>V. shikokianum</i>	-	1	sh-1 ^t	マルバウスゴ
<i>Hemimyrtillus</i>	<i>V. hirtum</i>	-	3	hi-1~3 ^z	ウスノキ
	<i>V. smallii</i>	-	1	sm-1 ^z	オオバスノキ
	<i>V. yakushimense</i>	-	1	ya-1 ^v	アクシバモドキ
<i>Bracteata</i>	<i>V. boninense</i>	-	4	bo-1~4 ^x	ムニンシャシヤンボ
	<i>V. bracteatum</i>	-	3	br-1~3 ^z	シャシヤンボ
<i>Ciliata</i>	<i>V. wrightii</i>	-	3	wr-1~3 ^z	ギーマ
	<i>V. oldhamii</i>	-	3	ol-1~3 ^z	ナツハゼ
<i>Oxycoccooides</i>	<i>V. ciliatum</i>	-	1	ci-1 ^s	アラゲナツハゼ
	<i>V. japonicum</i>	-	3	ja-1~3 ^v	アクシバ
<i>Praestantia</i>	<i>V. praestans</i>	-	1	pr-1 ^v	イワツツジ
<i>Vitis-idaea</i>	<i>V. vitis-idaea</i>	2x	1	vt-1 ^v	コケモモ
<i>Vaccinium</i>	<i>V. uliginosum</i>	2x,4x,6x	4	ul-1~4 ^v	クロマメノキ
合計			50		

a) 日本在来野生種は、学名に下線を付した。b) 既報より。c) 入手先: ^z 東京都農林総合研究センター(立川市)で保存, ^y 東京農工大学(府中市)で保存, ^x 小笠原, ^w 大関ナーセリー(茨城県), ^v 湯沢園芸(北海道), ^u 花和園芸(福島県), ^t 石田精華園(京都府), ^s 改良園(埼玉県)。

表2-2 供試したSSRマーカースの特徴

タイプ	マーカー ^a	GeneBank accession no.	リピートモチーフ	Dye	アニーリング 温度(°C)	期待される サイズ(bp)	検出された サイズ(bp)
EST	CA23F	CF810543	(AGA) ₆	FAM	62	150-170	156-182
	CA112F	CF810443	(AG) ₇	FAM	62	140-200	145-266
	CA421F	CF810704	(CT) ₂₅	FAM	60	180-250	149-240
	CA794F	CF810941	(GA) ₁₂	FAM	60	220-290	218-272
	CA855F	CF811000	(GA) ₁₄ (CGA) ₅	FAM	64	250-300	227-255
	NA800	CF811589	(TC) ₁₃	FAM	60	230-290	133-295
Genomic	GVCO001	LC028920	(TC) ₁₅	FAM	55	147-192	147-192
	GVCO002	LC028921	(TC) ₁₃ (CTT) ₅	FAM	55	198-266	198-254
	GVCO003	LC028922	(TC) ₁₄ (CT) ₈	FAM	55	172-204	172-202
	GVCO004	LC028923	(TC) ₅ (GA) ₂₉ (CTT) ₃	FAM	55	172-246	172-271
	GVCO005	LC028924	(CT) ₁₃ (CA) ₉ (TC) ₃	FAM	55	218-275	215-279
	GVCO008	LC028925	(CT) ₅ (CT) ₁₂	HEX	55	216-299	202-296

a) EST-SSR markers: Boches et al. (2005), Genomic-SSR markers: 榎川ら(2006)

2.2.3 樹形図の作成

22種で検出された推定アレルの出現率に基づき、unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) cluster analysis method により樹形図を作成した。ソフトウェアは PHYLIP 3.6 (Felsenstein, 2005) および MEGA 5.2 (Tamura et al., 2011) を用いた。

2.2.4 倍数性レベルの評価

日本在来野生種の倍数性レベルを評価するため、まずフローサイトメトリーを行った。未展開葉 5 mm 角程度をシャーレにとり、High Resolution DNA staining kit (CyStain UV Precise P, Partec) の A 液 (Nuclei Extraction Buffer) 400 µl を加えてカミソリで細断し、核を抽出した。30 µm フィルターでろ過した後、DAPI を含む B 液 (Staining Buffer) 1.6 ml を加えて染色した。この試料液をフローサイトメーター CyFlow PA (Partec) を使って分析し、相対的核 DNA 含量を表す相対蛍光強度 (Relative fluorescence intensity ; RFI) を 1 個体あたり 3 回測定して平均値を算出した。倍数性レベルが既知の 7 種 (2 倍体種 : *V. darrowi*, *V. macrocarpon*, *V. ovatum*, *V. myrtilus*, 4 倍体種 : *V. angustifolium*, *V. corymbosum*, 6 倍体種 : *V. virgatum*) のデータをもとに、RFI から倍数性レベルを推定するための検量線を作成した。この検量線を用いて、日本の野生種 15 種の倍数性レベルを評価した。

次に、SSR 多型解析による倍数性レベルの評価を行った。シングルローカスのマーカーにおける 1 個体あたりの最大アレル数をもとに、各種の倍数性レベルを推定した。

2.3 結果

2.3.1 多型解析

Vaccinium 属 22 種 50 個体において、*V. corymbosum* で開発された 12 種類の SSR マーカーにより多型解析を行った結果、全ての種・マーカーの組合せ (264) のうち 249 組合せ (94%) で推定アレルが検出された (表 2-3)。検出率をマーカーの種類別にみると、EST-SSR マーカーは 98% であり、Genomic-SSR マーカーの 90% に比べて高率であった。

検出された推定アレルのサイズは、多くのマーカーで既報から期待されるサイズの範囲と概ね一致した (表 2-2)。ただし、CA112F, CA421F, NA800 の 3 マーカーでは、期待されるサイズとの間に ±30 bp 以上と大きな差があった。

各マーカーで検出された推定アレル数は 9~84 本と幅広く、合計 432 本で、1 マーカーの平均出現数は 36.0 本であった (表 2-3)。各マーカーの種特異的な推定アレルは 2~26 本の幅で検出され、総アレル数の多いマーカーで多かった。

表2-3 ブルーベリーのSSRマーカーで検出された *Vaccinium* 属22種のアリル数

種	供試 個体数	EST-SSRマーカー										Genomic-SSRマーカー											
		CA		CA		CA		CA		CA		GVC0		GVC0		GVC0		GVC0		GVC0			
		23F	112F	112F	421F	794F	794F	855F	855F	855F	855F	800	800	001	001	002	002	003	003	004	004	005	005
<i>V. corymbosum</i>	6	2 (0)	4 (1)	9 (0)	7 (0)	7 (2)	28 (1)	9 (2)	9 (4)	5 (0)	13 (7)	9 (1)	20 (5)										
<i>V. vitifolium</i>	4	5 (0)	7 (3)	9 (0)	3 (0)	4 (0)	29 (4)	9 (1)	9 (3)	5 (1)	10 (3)	9 (3)	13 (2)										
<i>V. angustifolium</i>	1	2 (0)	2 (0)	4 (1)	4 (0)	3 (0)	13 (2)	4 (1)	2 (1)	4 (1)	4 (0)	3 (0)	5 (0)										
<i>V. darrowii</i>	1	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	2 (0)	9 (2)	2 (2)	1 (0)	1 (0)	2 (0)	1 (0)	1 (0)										
<i>V. ovatum</i>	1	1 (0)	2 (0)	1 (0)	1 (0)	2 (1)	2 (0)	2 (0)	1 (0)	1 (0)	2 (1)	2 (0)	0 (0)										
<i>V. macrocarpon</i>	2	1 (0)	2 (0)	3 (3)	2 (0)	3 (0)	8 (2)	3 (0)	0 (0)	3 (1)	4 (1)	1 (0)	0 (0)										
<i>V. myrtillus</i>	3	1 (0)	3 (2)	4 (1)	3 (6)	2 (0)	4 (0)	3 (0)	1 (0)	3 (1)	2 (0)	2 (0)	3 (0)										
<i>V. yatabei</i>	1	1 (0)	2 (0)	2 (1)	2 (0)	2 (0)	6 (0)	2 (0)	2 (0)	1 (0)	2 (0)	1 (1)	2 (0)										
<i>V. ovalifolium</i>	2	2 (0)	4 (3)	2 (0)	1 (0)	5 (0)	6 (0)	3 (0)	1 (0)	3 (0)	6 (2)	4 (1)	2 (1)										
<i>V. shikokianum</i>	1	2 (0)	4 (2)	3 (0)	4 (1)	3 (0)	12 (1)	3 (0)	3 (1)	3 (0)	2 (0)	4 (2)	2 (0)										
<i>V. hirtum</i>	3	4 (1)	10 (2)	10 (3)	8 (4)	11 (2)	32 (7)	9 (0)	6 (3)	6 (2)	6 (2)	10 (3)	11 (2)										
<i>V. smallii</i>	1	3 (1)	6 (0)	5 (0)	4 (1)	4 (0)	12 (2)	5 (0)	1 (0)	4 (2)	3 (1)	4 (1)	6 (1)										
<i>V. yakushimense</i>	1	1 (0)	2 (1)	2 (1)	1 (0)	2 (1)	10 (1)	1 (0)	1 (0)	2 (1)	2 (0)	1 (0)	6 (2)										
<i>V. boninense</i>	4	1 (0)	3 (0)	2 (0)	3 (0)	4 (0)	3 (1)	3 (0)	0 (0)	1 (1)	1 (0)	5 (1)	0 (0)										
<i>V. bracteatum</i>	3	1 (0)	3 (0)	5 (0)	4 (0)	4 (1)	6 (0)	4 (0)	0 (0)	3 (0)	4 (0)	3 (1)	0 (0)										
<i>V. wrightii</i>	3	2 (0)	2 (1)	6 (2)	4 (0)	3 (1)	6 (0)	4 (0)	0 (0)	2 (0)	4 (1)	6 (2)	0 (0)										
<i>V. oldhamii</i>	3	1 (0)	3 (0)	4 (0)	3 (0)	3 (1)	12 (1)	4 (1)	3 (1)	4 (0)	3 (0)	1 (0)	6 (2)										
<i>V. ciliatum</i>	1	2 (0)	2 (1)	2 (0)	2 (0)	2 (0)	4 (0)	2 (0)	1 (0)	2 (0)	2 (0)	2 (0)	4 (2)										
<i>V. japonicum</i>	3	1 (0)	2 (0)	2 (0)	4 (0)	1 (0)	2 (0)	2 (0)	2 (0)	3 (0)	4 (1)	3 (0)	0 (0)										
<i>V. praestans</i>	1	1 (0)	1 (1)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	3 (0)	2 (0)	1 (1)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	0 (0)										
<i>V. vitis-idaea</i>	1	2 (0)	2 (0)	0 (0)	2 (0)	1 (0)	6 (1)	2 (0)	0 (0)	2 (1)	1 (0)	2 (0)	0 (0)										
<i>V. uliginosum</i>	4	2 (0)	0 (0)	7 (4)	6 (1)	2 (0)	12 (1)	10 (2)	7 (1)	5 (2)	3 (1)	2 (1)	18 (7)										
推定の総アリル数/マーカー	9 (2)	34 (17)	40 (16)	26 (13)	28 (9)	84 (26)	28 (9)	30 (15)	31 (13)	38 (20)	34 (17)	50 (24)											

a) ■ = 推定アリルが全く検出されなかった。

2.3.2 樹形図

Vaccinium 属 22 種の遺伝的類縁関係を推定するため、SSR 多型解析をもとに UPGMA 法により樹形図を作成した (図 2-1)。複数個体を供試した 12 種は、いずれも独立したグループを形成した。22 種は大きく 3 つの群に分

かれた。クラスターIはブルーベリー3種および日本の落葉性野生種 11 種を含めた計 17 種、クラスターIIは *Bracteata* 節に属する日本の常緑性野生種 3 種、クラスターIIIは *V. myrtillus* と *V. praestans* (イワツツジ) の 2 種で構成された。

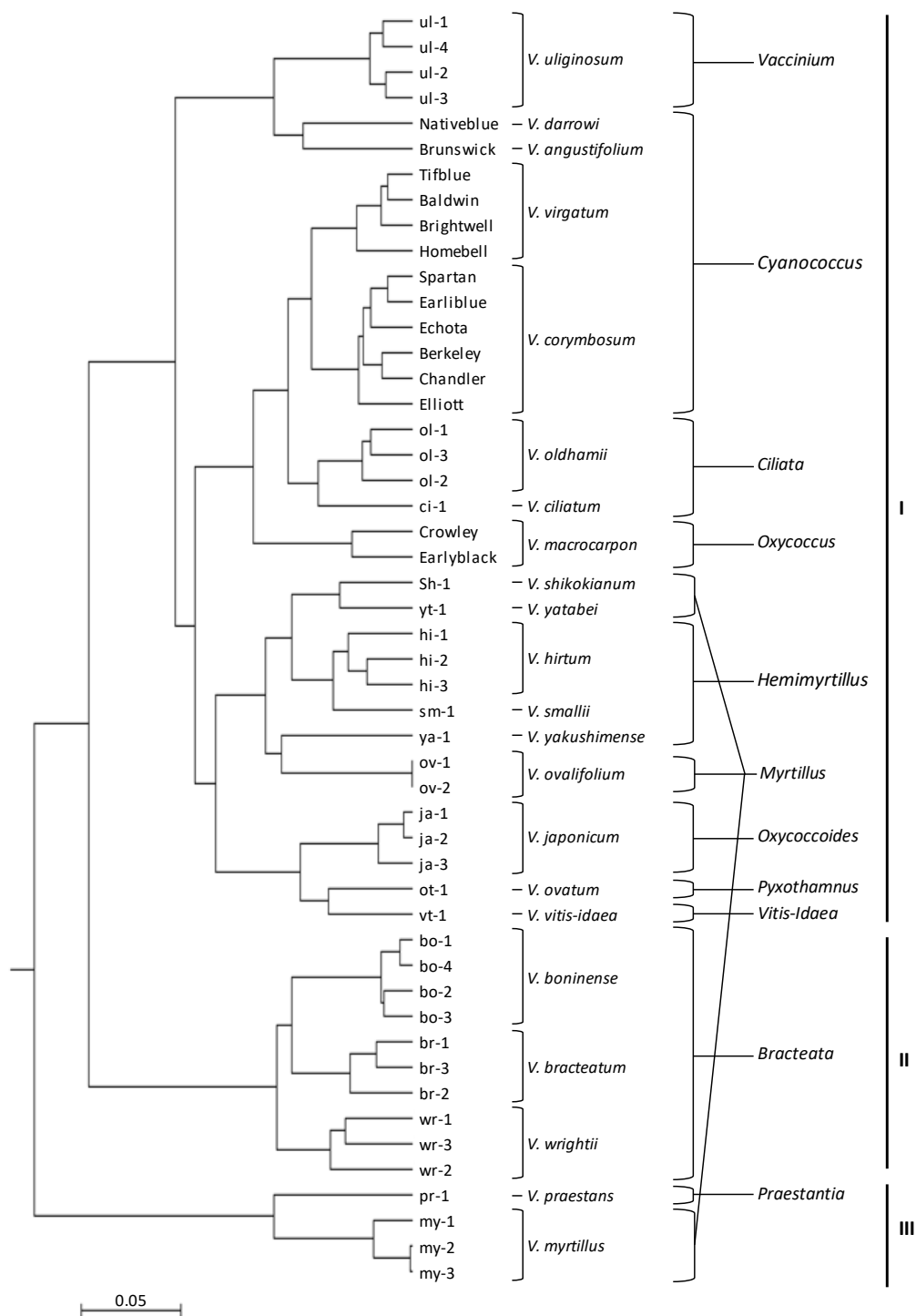


図2-1 UPGMA法による *Vaccinium* 属 22 種 (50 個体) の樹形図

2.3.3 倍数性レベルの評価

倍数性レベルが既知の7種では、フローサイトメトリーで測定した相対蛍光強度 (RFI) と倍数性レベルとの間に、高い正の相関関係 ($P < 0.001$, $r = 0.921$) が認められた (図 2-2)。日本の野生種 15 種について、得られた検量線をもとに倍数性レベルを算出した (表 2-4)。その結果、15 種のうち 10 種は、倍数性レベルの計算値が 1.8~2.4 の範囲であり、2 倍体であると推定された。それ以外の 5 種、*V. ovalifolium* (クロウスゴ), *V. shikokianum* (マルバウスゴ), *V. hirtum* (ウスノキ), *V. smallii* (オオバスノキ), *V. uliginosum* は 3.8 以上の値であったことから 4 倍性以上の倍数体であると推定された。

次に、SSR 多型解析による倍数性レベルの推定を行った。各々の種について、1 個体あたりの推定の最大アレル数を表 2-5 に示した。NA800, GVCO004, GVCO008 の 3 マーカーでは、多くの種でアレル数が既報またはフローサイトメトリーで示された倍数性レベルを超えて検出されたことから、複数の遺伝子座を増幅していることが判明した。それ以外の 9 マーカーは、*V. myrtillus* では 1 個体あたりの最大アレル数が 3 個と、倍数性レベル (2x) を超えて検出されたものの、それ以外の 21 種では 1 個体

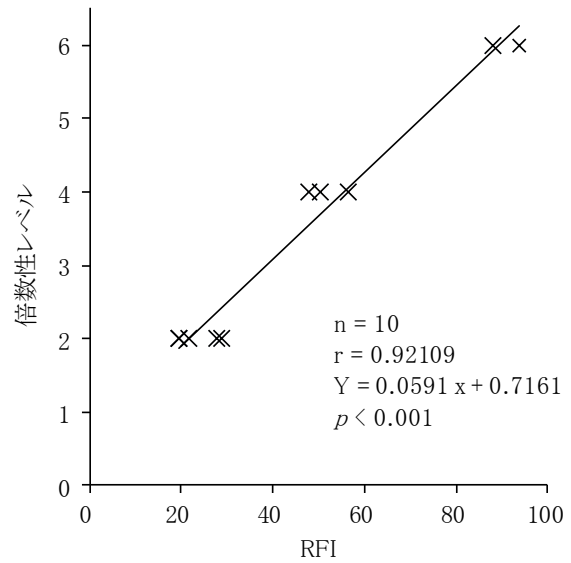


図2-2 倍数性レベルと相対的蛍光強度 (RFI) の関係

2倍体種は4種5個体 (*V. darrowi* 'Native blue', *V. macrocarpon* 'Crowly' および 'Early Black', *V. ovatum* 1個体, *V. myrtillus* 1個体), 4倍体種は2種3個体 (*V. angustifolium* 'Brunswick', *V. corymbosum* 'Berkeley' および 'Earliblue'), 6倍体種は1種2個体 (*V. virgatum* 'Brightwell' および 'Tifblue') とし、合計7種10個体を供試した。r は相関係数, Y は倍数性レベル, x はRFIを示す。

表2-4 フローサイトメトリーによる *Vaccinium* 属種の倍数性レベルの推定

節・種	個体名	RFI	倍数性レベル		
			計算値 ^a	推定値 ^b	
<i>Myrtillus</i>	<i>V. yatabei</i>	yt-1	21.1	2.0	2
	<i>V. ovalifolium</i>	ov-1	64.2	4.5	4-6
	<i>V. shikokianum</i>	sh-1	52.6	3.8	4
<i>Hemimyrtilus</i>	<i>V. hirtum</i>	hi-1	84.0	5.7	6
	<i>V. smallii</i>	sm-1	93.7	6.3	6
	<i>V. yakushinense</i>	ya-1	18.6	1.8	2
<i>Bracteata</i>	<i>V. boninense</i>	bo-3	27.3	2.3	2
	<i>V. bracteatum</i>	br-1	20.4	1.9	2
	<i>V. wrightii</i>	wr-1	28.8	2.4	2
<i>Ciliata</i>	<i>V. oldhamii</i>	ol-2	23.1	2.1	2
	<i>V. ciliatum</i>	ci-1	19.2	1.9	2
<i>Oxycoccoides</i>	<i>V. japonicum</i>	ja-1	26.7	2.3	2
<i>Praestantia</i>	<i>V. praestans</i>	pr-1	24.6	2.2	2
<i>Vitis-Idaea</i>	<i>V. vitis-idaea</i>	vt-1	18.1	1.8	2
<i>Vaccinium</i>	<i>V. uliginosum</i>	ul-3	69.0	4.8	4-6

a) 計算値 = $0.0591 \times \text{RFI} + 0.7161$; 各種のゲノムサイズが同等であるとの仮定に基づく。

b) 計算値に基づき、偶数倍数体 (isoploid) の可能性が高いことも加味して、倍数性レベルを推定した。

あたりの最大アレル数がいずれも各種の倍数性レベル以下であった。そこで、これら9マーカーは21種ではシングルローカスであると推定し、1個体あたりの最大アレル数をもとに、21種の倍数性レベルを評価した(表2-5)。

その結果、13種は2倍体、8種は4倍体以上の倍数体と推定され、これらはいずれも既報の値またはフローサイトメトリーの推定値と一致した。

表2-5 SSRマーカーによる1個体あたりの最大アレル数および倍数性レベルの推定

種	推定の最大アレル数/個体 ^a													Genomic-SSRマーカー		倍数性レベルの推定値	
	EST-SSRマーカー						GVCO							FCM ^c		SSR ^d	
	CA 23F	CA 112F	CA 421F	CA 794F	CA 855F	NA 800 ^b	001	002	003	004 ^b	005	008 ^b	005	008 ^b	FCM ^c		SSR ^d
<i>V. corymbosum</i>	2	3	4	4	4	6	4	4	3	11	4	7	4	4x	4x		
<i>V. virgatum</i>	5	5	6	2	4	7	6	5	3	8	6	8	6x	6x	6x		
<i>V. angustifolium</i>	2	2	4	4	3	4	4	2	4	5	3	13	4x	4x	4x		
<i>V. darrowi</i>	1	1	1	1	2	2	2	1	1	1	2	1	2x	2x	2x		
<i>V. ovatum</i>	1	2	1	1	2	2	2	1	1	0	2	0	2x	2x	2x		
<i>V. macrocarpon</i>	1	1	2	1	2	3	2	0	2	0	1	3	2x	2x	2x		
<i>V. myrtillus</i>	1	3	2	3	1	2	2	1	2	3	2	0	2x	2x	-		
<i>V. yatabei</i>	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	3	2x	2x	2x		
<i>V. ovalifolium</i>	2	4	2	1	5	6	3	1	3	2	4	0	4-6x	4-6x	5-6x		
<i>V. shikokianum</i>	2	4	3	4	3	2	3	3	3	2	4	6	4x	4x	4x		
<i>V. hirtum</i>	3	6	6	5	6	4	5	3	5	8	5	12	6x	6x	6x		
<i>V. smallii</i>	3	6	5	4	4	3	5	1	4	6	4	8	6x	6x	6x		
<i>V. yakushimense</i>	1	2	2	1	2	2	1	1	2	6	1	6	2x	2x	2x		
<i>V. boninense</i>	1	2	2	2	2	1	2	0	1	0	2	0	2x	2x	2x		
<i>V. bracteatum</i>	1	2	2	2	2	2	2	0	2	0	2	0	2x	2x	2x		
<i>V. wrightii</i>	2	2	2	2	2	2	2	0	2	0	2	2	2x	2x	2x		
<i>V. oldhamii</i>	1	1	2	2	2	2	2	2	2	3	1	3	2x	2x	2x		
<i>V. ciliatum</i>	2	2	2	2	2	2	2	1	2	4	2	1	2x	2x	2x		
<i>V. japonicum</i>	1	2	2	2	1	3	2	2	2	0	2	0	2x	2x	2x		
<i>V. praestans</i>	2	1	1	1	1	1	2	1	1	0	1	0	2x	2x	2x		
<i>V. vitis-idaea</i>	2	2	0	2	1	1	2	0	2	0	2	5	2x	2x	2x		
<i>V. uliginosum</i>	2	0	3	4	2	3	6	5	3	10	2	5	4-6x	4-6x	6x		

a) ■ = 倍数性レベルを超えて推定アレルが検出された。b) マルチローカスのマーカー。c) 斜字はフローサイトメトリー(FCM)による推定値(表2-4)。d) シングルローカスのマーカーで検出された1個体あたりの最大アレル数に基づき、偶数倍数体(isoploid)の可能性が高いことも加味して倍数性レベルを推定した。-は未実施。

2.4 考察

(1) ブルーベリーの SSR マーカーの適用性

本章では、*V. corymbosum* で開発された 12 種類の SSR マーカーが、日本の野生種 15 種を含めた多くの *Vaccinium* 属種の多型解析に有効であることを確認した。特に、EST-SSR マーカーは、供試した 22 種においてほぼ 100% の確率で推定アリルを検出することができた。EST は保存性の高い領域を増幅しているため、Genomic-SSR マーカーに比べてより汎用性が高く、広範な *Vaccinium* 属種に適用できると考えられる。また、SSR 解析で推定の種特異的アリルを計 181 本得ることができた。これらはブルーベリーと日本の野生種の種間交雑育種を進めるにあたり、雑種性の評価に利用できると考えられる。

なお、供試した 12 マーカーのうち CA112F, CA421F, NA800 の 3 マーカーでは、既報から期待されるサイズと検出されたサイズの間に大きな差がみられた。これらのマーカーについては、ターゲットとする遺伝子座以外の領域を増幅している可能性がある。

また、*V. ovalifolium* は、実生苗として入手した 2 個体を供試したが、SSR 解析では 12 マーカーの全ての多型が一致したことから、単一クローンの可能性が高い。この結果から、本論文で用いた SSR マーカーは再現性に優れ、信頼性が高いと考えられる。

(2) 遺伝的類縁関係の評価

V. corymbosum で開発された 12 種類の SSR マーカーを用いて、日本の野生種 15 種を含む *Vaccinium* 属 22 種の多型解析を行った。その結果に基づき作成した樹形図では、各々の種ごとに明確なグループを形成した。また、複数種を供試した 5 節について樹形図内での分布をみると、*Bracteata* 節の 3 種と *Cilliata* 節の 2 種は各々単一のクラスターを形成し、*Hemimyrtillus* 節の 3 種も概ね近傍域に分布した。一方、*Cyanococcus* 節では 4 種全てが同一のクラスターにあるものの、*V. corymbosum* および *V. virgatum* の 2 種と、残り 2 種とに別れて分布した。また、*Myrtillus* 節では、4 種のうち 1 種が異なるクラスターに別れて分布した。従来の形態学的特性に基づく分類と本樹形図とを比較すると、このように一部の節では相違がみられたものの、全ての種レベルおよび多くの節レベルにおいて両者は概ね一致していた。これらのことから、*V. corymbosum* で開発された SSR マーカーは、*Vaccinium* 属の広範な種間の解析にも有効であると考えられた。

Cyanococcus 節の 4 種については、Bian et al. (2014) が SSR 多型解析をもとに作成した樹形図では、*V. darrowi* および *V. angustifolium* が、*V. corymbosum* (4x) および *V.*

virgatum よりも近傍に分布しており、この傾向は本樹形図と一致していた。また、*Myrtillus* 節の 4 種については、日本在来野生種である *V. yatabei* (ヒメウスノキ)、*V. ovalifolium*、*V. shikokianum* の 3 種はクラスター I の中で比較的近傍に分布したものの、*V. myrtillus* のみはクラスター III に分類された。このことから、*V. myrtillus* は他の 3 種に対して類縁関係が遠いことが示唆された。*V. myrtillus* が、日本の野生種である *V. praestans* と同一のクラスターに含まれたことは興味深い結果である。このことは、節は異なるものの、2 種の類縁関係が近いことを示唆する。*V. myrtillus* は、機能性成分のアントシアニン含量がブルーベリーよりも高いことから(入角ら, 2013)、日本で注目されている。将来的に *V. myrtillus* を日本の栽培環境に適合させるための育種を行うのであれば、*V. praestans* は育種素材として有用であるかもしれない。ただし、Powell and Kron (2002) と Tsutsumi (2011) は、ITS, *matK* などの遺伝子領域を用いた解析により樹形図を作成し、*Myrtillus* 節の 3 種 (*V. myrtillus*, *V. yatabei*, *V. ovalifolium*) が近傍域に分布することを報告している。本論文の解析に用いた 6 種類の EST-SSR マーカーは、いずれも花芽の低温順化に関わる EST ライブラリーをもとに作成されたマーカーであるため (Boches et al., 2005)、特定の形質に偏った評価となっている可能性がある。本節の類縁関係の評価については、さらにマーカー数を増やして検討することが必要である。

日本の在来野生種のうち、これまでにブルーベリーとの種間雑種作出に成功しているのは、*Vaccinium* 節 *V. uliginosum*、*Bracteata* 節 *V. bracteatum*、*Hemimyrtillus* 節 *V. smallii* の 3 種である。*V. uliginosum* (執行ら, 2014) と *V. bracteatum* (Tsuda et al., 2013) では *V. corymbosum* との節間雑種が作出され、*V. smallii* (Ehlfeldt and Ballington, 2012) ではブルーベリーの 6 倍体雑種 (*V. corymbosum* forma *virgatum* derivative) との間に推定雑種が得られている。本章の樹形図に基づく推定では、ブルーベリーとの遺伝的類縁関係は *V. uliginosum*、*V. smallii* では相対的に近く、*V. bracteatum* では遠い。類縁関係の遠い *V. bracteatum* でもブルーベリーとの雑種が得られていることは興味深い事実であり、*Bracteata* 節の他の種でもブルーベリーとの雑種を得ることが可能かもしれない。なお、Tsuda et al. (2013) は、2 倍体の *V. bracteatum* では *V. corymbosum* (4x) と交雑できず、コルヒチン処理で染色体倍加した 4 倍体の *V. bracteatum* で節間雑種が得られたと報告している。また、ブルーベリーとの雑種が得られている他の 2 種 (*V. uliginosum*, *V. smallii*) はともに 4 倍性以上の倍数性種である。*Vaccinium* 属の種間交雑では一般に、同倍数体間 (2x-2x, 4x-4x, 6x-6x) では雑種が

容易に得られ、異倍数体間では困難とされるが (Galletta, 1975), 日本の野生種においても、種間交雑における倍数性の障壁の影響は大きいことが示唆される。

小笠原諸島固有種の *V. boninense* を含めた *Bracteata* 節の3種は、いずれもブルーベリーに比べて耐暑性、耐乾性に優れ、ブルーベリーの温暖地適応性を高めるのに有望な素材である。3種は外部形態がよく似ており、*V. boninense* は *V. wrightii* の変種とする説もある (牧野, 1989)。しかし、本樹形図では3種が明確に区別され、各々が別種であることが強く示唆された。これら3種については、ブルーベリーの育種素材候補としての有用性を個別に評価することが重要と考える。

(3) 倍数性レベルの評価

本章では、多くの日本在来野生種について、これまで不明であった倍数性レベルをフローサイトメトリーにより推定することができた。これらの知見は、野生種を育種利用するにあたって重要な基礎資料となる。

また、シングルローカスの SSR マーカー9種類を用いて、1個体あたりの最大アレル数に基づき、21種の倍数性レベルを推定したところ、いずれも既報やフローサイトメトリーに基づく倍数性レベルと一致した。このことから、9マーカーは、*Vaccinium* 属の多くの種の倍数性レベルの推定に有効であると考えられた。また、倍数性レベルを相対的核 DNA 含量に基づいて推定するフローサイトメトリーと、1遺伝子座あたりの最大アレル数に基づいて推定する SSR 多型解析を組み合わせることで、より正確に倍数性レベルの評価ができると考えられた。なお、*V. myrtillus* (2x) のみは、21種でシングルローカスと推定された9マーカーのうち2種類で最大アレル数が3個と、倍数性レベルを超えて検出された。本章の樹形図で、*V. myrtillus* と *V. corymbosum* の類縁関係は極めて遠いと推定されたことから、*V. corymbosum* でシングルローカスであった SSR マーカーが、*V. myrtillus* ではマルチローカスになっていたと考えられる。

以上のことから、*V. corymbosum* の SSR マーカーは、これまでほとんど DNA 解析が行われてこなかった日本の野生種15種を含め、広範な *Vaccinium* 属種の多型解析に有効であり、遺伝的類縁関係の推定に利用できると考えられた。また、これらのマーカーは種間交雑育種における種特異的マーカーとして利用でき、倍数性レベルの推定にも有効であると考えられた。

第3章 *Vaccinium* 属種の交雑能力の評価

3.1 緒言

ブルーベリーの主要な栽培種である *V. corymbosum* と *V. virgatum* の種間雑種は、稔性の低い5倍体となる (Vorsa et al., 1987)。しかし、*V. corymbosum* (Vorsa et al., 1987) または *V. virgatum* (Lavery and Vorsa, 1991) との戻し交雑により稔性の高い後代が得られることから、5倍体を両種の遺伝子の橋渡し植物として用いた戻し交雑育種が可能である。また、米国では5倍体雑種を直接的に品種化した事例もある (Ballington, 2009)。これら2種の種間交雑は、*V. corymbosum* のもつ優れた果実品質と *V. virgatum* のもつ温暖地適応性や晩生性を兼ね備えた、日本型のサザンハイブッシュブルーベリー (本章では SHB と略す) 品種を開発する上で魅力的な組合せといえる。

両種の正逆交配については、Galletta (1975) が *V. corymbosum* を種子親に用いたほうが逆交配よりも成功率が高いと述べている一方で、Lyrene (1988) は2種の正逆交配において得られる実生数はほとんど変わらないと報告している。また、Lyrene (1988) は、両種の交雑の成功率は遺伝子型に影響されると述べているが、優れた育種母本になり得る栽培品種を種間交雑に利用するにあたっての知見はほとんどない。したがって、両種の種間交雑に関しては、効率的な5倍体雑種の作出を可能とするために、正逆交配の方向性や品種の違いが交雑能力に及ぼす影響を評価しておくことが必要である。

一方、ブルーベリーと日本在来野生種との種間交雑については、これまでに報告があるのは、*V. uliginosum* (執行ら, 2014)、*V. smallii* (Ehlenfeldt and Ballington, 2012)、*V. bracteatum* (Tsuda et al., 2013) の3種のみであり、知見が非常に少ないのが現状である。野生種の育種利用を進めるためにはまず、ブルーベリーとの交雑能力や、交雑の成否を左右する要因を明らかにする必要がある。

種間交雑の親和性には、一般に遺伝的類縁関係や倍数性レベルが大きく影響することが知られている。*Vaccinium* 属においても、同倍数体間では雑種が容易に得られるが異倍数体間では困難とされている (Galletta, 1975)。SHB 育成のもととなった米国在来野生種の *V. darrowi* (2x) は *Cyanococcus* 節に属し、*V. corymbosum* とは遺伝的類縁関係が近いものの、倍数性レベルが異なっている。*V. darrowi* は、非還元配偶子 (2n) を形成することで *V. corymbosum* との直接的な交雑が可能となった (Draper and Hancock, 2003)。また、*V. darrowi* を種子親とし、同じく米国野生種の *V. elliotii* (2x) を花粉親として作出された TO-303 という種間雑種がある。TO-303 は、温暖地適応性を有し、関東以南で栽培しやすい観賞用品

種として日本でも栽培されているが、この種間雑種が *V. darrowi* の持つブルーベリーとの交雑能力を受け継いでいるかどうかは不明である。*V. darrowi* および TO-303 は、*Vaccinium* 属の種間交雑に影響する諸要因を解析する上で興味深い素材といえる。

日本在来野生種のうち、*Bracteata* 節の *V. boninense* および *V. wrightii* は亜熱帯地域に自生することから（伊藤・菅原，2009；2010），高い耐暑性や耐乾性を有すると考えられる。また，同節の *V. bracteatum* は温暖地に適合し，広い土壌適応性も有する（Luby et al., 1991）。*Ciliata* 節の *V. oldhamii* は，果実のアントシアニン含量がブルーベリーよりも高いことが報告されている（津田ら，2014）。日本型の SHB や，果実の機能性成分がより多いブルーベリー品種を開発するためには，これらの野生種が育種素材として有望である。一方，第2章ではこれらの種がいずれも2倍体と確認され，*Bracteata* 節の3種はブルーベリーとの類縁関係が比較的遠いと推定された。したがって，これらの野生種とブルーベリーとの雑種作出は困難

となることが予想される。

そこで本章では，ブルーベリー種，前述の米国在来野生種および日本在来野生種を含めた *Vaccinium* 属 8 種類を供試して総当たりの正逆交配を行い，各々の交雑能力を評価した。特にブルーベリー2 種間の交配では，正逆交配の方向性や品種の違いが交雑能力に及ぼす影響を詳細に調査した。また，得られた雑種については，野生種等に由来する有用形質や稔性の有無を調査し，新しい育種素材としての可能性を評価した。

3.2 材料および方法

3.2.1 供試材料

Cyanococcus 節のブルーベリー2 種，*V. darrowi*，種間雑種 TO-303，*Ciliata* 節および *Bracteata* 節の日本在来野生種 4 種，計 8 種類を交配に供試した（表 3-1）。ブルーベリー2 種は東京農工大学（東京都府中市）の圃場で，その他の種は東京都農林総合研究センター（東京都立川市）の圃場で栽培されている個体を用いた。

表3-1 交配に供試した *Vaccinium* 属種および種間雑種

節	種類	和名・流通名	倍数性 レベル	供試品種 ・個体数	開花期 ^a	収穫期 ^a
<i>Cyanococcus</i>	<i>V. corymbosum</i>	ハイブッシュブルーベリー	4x	17 ^c	4～5月	6～7月
	<i>V. virgatum</i>	ラビットアイブルーベリー	6x	8 ^d	4～5月	7～9月
	<i>V. darrowi</i>	-	2x	1 ^e	4～5月	7～8月
	TO-303 ^b (<i>V. darrowi</i> × <i>V. ellottii</i>)	-	2x	1	4～5月	7～8月
<i>Bracteata</i>	<i>V. boninense</i>	ムニンジャシャンボ	2x	15	1～5月	12～1月
	<i>V. bracteatum</i>	ジャシャンボ	2x	3	6～7月	11月
	<i>V. wrightii</i>	ギーマ	2x	2	2～4月	11～12月
<i>Ciliata</i>	<i>V. oldhamii</i>	ナツハゼ	2x	5	6月	10～11月

a) 東京都農林総合研究センター圃場(東京都立川市)において。

b) 米国南部に自生する2倍体野生種間の種間雑種。TO-303は系統名。

c) ‘Berkeley, Bluecrop, Chandler, Coville, Collins, Darrow, Denise, Dixi, Earliblue, Echota, Elliott, Herbert, Spartan, Weymouth, O’Neal, Flordablue, Sunshine Blue’

d) ‘Austin, Baldwin, Bluebelle, Brightwell, Delite, Homebell, Tifblue, Woodard’

e) ‘Native blue’

3.2.2 正逆交配

Vaccinium 属 8 種類間で総当りの正逆交配を行った。また、供試した品種・個体の稔性の有無を確認するため、種内交配および自殖交配を行った。交配は 2003~2007, 2012, 2013 年の計 7 ヶ年、各種子親の開花期に行った。正逆交配の組合せは、ブルーベリー種間では 2 組合せ(品種間では 99 組合せ)、ブルーベリーと野生種間では 24 組合せ、野生種間では 30 組合せ、合計 56 組合せとした。1 組合せあたりの交配数は 14 花以上とし、種子親の開花直前の蕾を除雄した後、花粉親の開花直後の花から採取した花粉をただちに授粉した。その後、他の花粉の混入を防ぐためにパラフィン紙の袋で 2 週間袋がけを行った。種子親と花粉親の開花期が異なる場合には(表 3-1)、1~10 ヶ月間、5°C で乾燥冷蔵保存した花粉を交配に用いた。各々の収穫期に完熟果を収穫し、結実率を調査した。また、完熟果から完全種子を採取し、1 果あたりの種子数を算出した。

果実から採取した完全種子は、有効塩素 1% の次亜塩素酸溶液で 15 分間殺菌処理した後、WPM (Lloyd and McCown, 1981) を基本とし、ショ糖 20 g/L, ゲランガム 3 g/L, pH 4.5 の培地 30 ml を含む直径 9 cm のプラシャーレ培地に無菌播種し、シャーレはパラフィルムで密封した。ブルーベリー 2 種および *V. oldhamii* の種子については、発芽誘導のために 5°C 処理を各々 2 ヶ月および 6 ヶ月間行った後、20~22°C, 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光条件下に置いた。その他の種子は、無菌播種後ただちに同条件下に置いた。24 週目に、発芽した実生の数を調査し、発芽率を算出した。

各々の交配において、3 種類のパラメーター(結実率、1 果あたりの種子数および発芽率)を測定し、稔性および交雑能力の程度を示す「交配 1 花あたりの実生数」を以下の計算式から算出した；1 果あたりの種子数×結実率(%)×1/100×発芽率(%)×1/100。

3.2.3 倍数性レベルおよび雑種性の評価

交配で得られた実生個体について、フローサイトメトリーにより倍数性レベルを評価した。実験操作は 2.2.4 と同様に行った。また、SSR マーカーを用いた親子鑑定により、実生個体の雑種性を評価した。SSR マーカーは、第 2 章でシングルローカスと判明した 9 マーカー(CA23F, CA112F, CA421F, CA794F, CA855F, GVC0001, GVC0002, GVC0003, GVC0005)を用いた。実験操作は 2.2.2 と同様に行った。

3.2.4 交雑能力の評価

Vaccinium 属 8 種類間の正逆交配における交雑能力の程度を、交配 1 花あたりの実生数に基づき 5 段階で相対評価した(表 3-10(4))。

3.2.5 雑種の外部形態等の評価

交配で得られた雑種個体は、順化、鉢上げの後に温室で栽培した。3 年生以上に生育した個体については、その基本的な特性を明らかにするために、葉・花・果実の特徴、開花期、収穫期を調査した。調査項目・方法は、農林水産省の「すのき(ブルーベリー)属」または「シャシャンボ種」の審査基準・特性表に準じた。調査は 2012~2014 年に行い、花・果実は各々の開花・収穫盛期に、葉は夏期に、各 5 個を測定して平均値を算出した。

3.2.6 雑種の稔性の評価

3 年生以上に生育した雑種のうち、花数が十分に確保できた個体については、稔性および交雑能力の程度を明らかにするために自殖交配およびブルーベリーとの正逆交配を行った。交配は 2012~2013 年の各種子親の開花期に実施した。交配以降の作業は 3.2.2 と同様に行い、「交配 1 花あたりの実生数」を算出して各雑種個体の稔性および交雑能力を評価した。

3.3 結果

3.3.1 正逆交配の結果

(1) 供試個体の稔性

供試した個体が正常な稔性を有するかどうかを確認するため、各種類の 1~2 個体について交配試験を行った(表 3-2)。ブルーベリー 2 種(*V. corymbosum*, *V. virgatum*) および日本在来野生種 4 種(*V. boninense*, *V. bracteatum*, *V. wrightii*, *V. oldhamii*) で種内交配を行ったところ、いずれの個体からも実生が得られ、交配 1 花あたりの実生数は 1.04~6.60 個であった。一方、これら 6 種の自殖交配では、多くの個体で実生が得られず、得られた場合も 1 花あたりの実生数は 0.12~0.41 個と、種内交配に比べて著しく少なかった。これらのことから、6 種の供試個体はいずれも正常な稔性を有し、自家不和合性の傾向であることが確認された。*V. darrowi* および種間雑種 TO-303 については自殖交配のみを行った。その結果、*V. darrowi* では低率で種子が得られたが発芽せず、TO-303 では結実率は 88% と高かったが種子が得られず、どちらも稔性があることを確認できなかった。

(2) ブルーベリー種間の正逆交配

V. corymbosum と *V. virgatum* の正逆交配の結果を、まず品種ごとの交配組合せでみると、99 組合せのうち 88 組合せ (89%) で結実し、85 組合せ (86%) で充実した完全種子が得られ、64 組合せ (65%) で発芽実生が得られた (表 3-3)。*V. corymbosum* × *V. virgatum* 交配では、結実率が 0~100%、1 果あたりの種子数が 0~18.7 個、発芽率が 0~97%、交配 1 花あたりの実生数が 0~6.41 個であった。正逆の交配の方向性によってこれらのパラメーターに明確な違いはみられなかった。

3 種類のパラメーターおよび交配 1 花あたりの実生数に基づき、種子親と花粉親のそれぞれについて交雑能力の品種間差を評価した (表 3-4)。Kruskal Wallis 順位検定の結果、*V. corymbosum* × *V. virgatum* では、全ての項目で種子親品種間に有意差が認められた。しかし、花粉親品種間では結実率以外の項目には差が無かったことから、*V. corymbosum* × *V. virgatum* では特に *V. corymbosum* の遺伝子型が交雑能力に大きく影響することが示された。また、逆交配の場合は、種子親品種間では 1 果あたりの種子数のみに、花粉親品種間では 1 果あたりの種子数を除く全ての項目で有意差が認められたことから、逆交配においても *V. corymbosum* の遺伝子型が大きく影響することが示された。

交配 1 花あたりの実生数を *V. corymbosum* の品種別にみると、*V. corymbosum* × *V. virgatum* では種子親が 'Elliott, Dixi, Spartan' の場合に 1.48~2.31 個と多く、'Collins, Flordablue' の場合に 0.02~0.07 個体と少なかった (表 3-4)。また、逆交配で *V. corymbosum* を花粉親として用いた場合、'Herbert, Spartan' では 0.51~0.60 個体と多く 'Flordablue, Elliott, Dexi' では 0.04 個体以下と少なかった。種間交配における *V. corymbosum* 品種の交雑能力を総合的に評価すると、'Spartan' は種子親としても花粉親としても交雑能力が高かった。'Elliott, Dexi' は種子親としては高かったものの花粉親としては低かった。また、'Flordablue' はどちらの親として用いても稔性が著しく低かった。

ブルーベリー 2 種間の正逆交配について、上記のデータを表 3-5 にまとめた。3 種類のパラメーターおよび 1 花あたりの実生数について、正逆交配間で Mann-Whitney 順位和検定を行った結果、全ての項目で有意差が認められた。交配 1 花あたりの実生数は、*V. corymbosum* × *V. virgatum* が平均 0.96 個で、逆交配より 3.8 倍多かった。

(3) ブルーベリーと野生種等の正逆交配

ブルーベリー 2 種と野生種等 6 種類との正逆交配では、

24 組合せ中 8 組合せで種子が得られ、3 組合せでのみ交雑実生が得られた (表 3-6)。1 花あたりの実生数はいずれも 0.001~0.014 個であり、ブルーベリー種間の交配と比べて著しく少なかった。交雑実生が得られたのは TO-303 × *V. corymbosum*, *V. corymbosum* × *V. oldhamii*, *V. boninense* × *V. corymbosum* の 3 組合せで、各 1 個体であった。

(4) 野生種等間の正逆交配

野生種等 6 種類間の正逆交配では、30 組合せ中 8 組合せで交雑実生が得られた (表 3-7)。交配 1 花あたりの実生数は 0.025~1.861 個であり、ブルーベリーと野生種等間の交配に比べて多かった。8 組合せ中の 5 組合せは *Bracteata* 節に属する *V. boninense*, *V. wrightii*, *V. bracteatum* 間の交配であった。残りの 3 組合せは TO-303 × *V. oldhamii*, TO-303 × *V. boninense*, TO-303 × *V. wrightii* で、いずれも TO-303 を種子親とする交配であった。

3-3-2 交雑実生の倍数性レベルおよび雑種性の評価

ブルーベリー 2 種の正逆交配で得られた交雑実生について、フローサイトメトリーで倍数性レベルを調査した (図 3-1)。その結果、*V. corymbosum* × *V. virgatum* では 274 個体のうち 99.6% が、逆交配では 268 個体のうち 99.3% が 5 倍体であり、ブルーベリー 2 種の正逆交配で得られた交雑実生はほぼ 100% の確率で種間雑種であることが確認された。

ブルーベリーと野生種等の交配では 3 種類 (3 個体) の交雑実生が得られ、野生種等間の交配では 8 種類 (21 個体) の交雑実生が得られた (表 3-8)。このうち、発芽後順調に生育した計 9 種類 22 個体について、フローサイトメトリーにより倍数性レベルを評価した。その結果、*V. corymbosum* (4x) と TO-303 (2x) または *V. oldhamii* (2x) との交雑実生 2 個体はどちらも 4 倍体であり、その他の野生種等間の交雑実生 20 個体はいずれも両親と同じく 2 倍体であることが判明した。次に、SSR マーカーを用いて親子鑑定を行った (表 3-9)。各実生個体とその両親個体間でアレルを比較すると、*V. corymbosum* × *V. oldhamii* 1 個体を除く 8 種類 21 個体は全てのマーカーで両親と共通するアレルのみを有し、親子間でアレルの出現に矛盾がなかったことから、雑種であることが確認できた (表 3-8)。*V. corymbosum* × *V. oldhamii* の 1 個体は、全てのマーカーで母親および他の *V. corymbosum* 品種と共通のアレルのみを有し (データ省略)、4 倍体であることから、*V. corymbosum* 花粉の混入により生じた種内交雑実生と推定された。

表3-2 供試個体の稔性評価^a

種類	交配組合せ		交配 花数	結実率 (%)	種子数 /果	発芽率 (%)	実生数 /花
	♀	♂					
種内交配							
<i>V. corymbosum</i>	Berkeley	Spartan	16	81	3.4	77	2.13
	Spartan	Berkeley	16	69	13.1	63	5.69
<i>V. virgatum</i>	Tifblue	Brightwell	17	41	6.4	56	1.47
	Woodard	Tifblue	28	68	3.6	76	1.83
<i>V. boninense</i>	M-3	M-1	59	59	5.8	91	3.13
	M-4	M-1	18	100	7.3	86	6.29
<i>V. bracteatum</i>	S-1	S-2	20	65	3.3	98	2.10
	S-2	S-1	23	52	2.2	92	1.04
<i>V. wrightii</i>	G-1	G-2	23	17	18.0	94	2.96
	G-2	G-1	14	20	39.0	85	6.60
<i>V. oldhamii</i>	N-3	N-4	20	95	8.1	73	5.60
	N-4	N-3	20	75	4.3	65	2.10
自殖交配							
<i>V. corymbosum</i>	Berkeley		17	71	1.1	54	0.41
	Spartan		18	39	0.6	0	0
<i>V. virgatum</i>	Tifblue		19	0			0
	Woodard		33	6	3.0	64	0.12
<i>V. boninense</i>	M-3		15	0			0
	M-4		14	0			0
<i>V. bracteatum</i>	S-1		15	0			0
	S-2		20	20	2.0	50	0.20
<i>V. wrightii</i>	G-1		17	47	0.0		0
	G-2		18	0			0
<i>V. oldhamii</i>	N-3		20	0			0
	N-4		20	0			0
<i>V. darrowi</i>	Native blue		15	7	1.0	0	0
<i>V. darrowi</i> × <i>V. elliotii</i>	TO-303		24	88	0.0		0

a) 2003～2007, 2012～2013年交配。*V. darrowi*およびTO-303は自殖交配のみ行った。

表3-3 *V. corymbosum* 10品種と *V. virgatum* 5品種との正逆交配における結実率, 種子数および発芽率^a

交配組合せ		交配花数	結実率 (%)	種子数 /果	発芽率 (%)	実生数 /花
♀	♂					
<i>V. corymbosum</i> × <i>V. virgatum</i>						
Berkeley	Baldwin	13	0	0.0		0.00
	Brightwell	14	71	8.2	20	1.17
	Homebell	29	55	2.3	0	0.00
	Tifblue	13	85	7.8	50	3.31
	Woodard	22	36	2.6	47	0.45
Collins	Baldwin	24	33	2.1	0	0.00
	Brightwell	25	100	4.4	0	0.00
	Homebell	14	93	2.9	0	0.00
	Tifblue	19	100	2.6	3	0.09
	Woodard	12	92	3.5	0	0.00
Darrow	Baldwin	13	38	1.6	63	0.38
	Brightwell	20	80	7.5	50	3.00
	Homebell	18	39	1.1	20	0.09
	Tifblue	16	75	5.3	0	0.00
	Woodard	18	78	2.1	47	0.78
Dixi	Baldwin	28	14	2.0	0	0.00
	Brightwell	18	67	10.4	67	4.63
	Homebell	16	88	5.9	43	2.22
	Tifblue	17	71	3.5	43	1.07
	Woodard	14	29	1.3	75	0.27
Earliblue	Baldwin	16	81	12.8	13	1.38
	Brightwell	10	90	18.0	3	0.54
	Homebell	16	88	10.5	7	0.61
	Tifblue	12	100	18.3	10	1.83
	Woodard	10	90	3.0	7	0.20
Elliott	Baldwin	20	40	3.0	64	0.76
	Brightwell	17	88	5.7	43	2.17
	Homebell	15	93	15.9	43	6.41
	Tifblue	81	41	3.4	97	1.35
	Woodard	14	64	5.7	23	0.85
Flordablue	Baldwin	25	28	2.7	0	0.00
	Brightwell	25	36	4.4	7	0.11
	Homebell	19	37	3.4	9	0.11
	Tifblue	23	48	1.8	13	0.11
	Woodard	28	11	1.7	0	0.00
Herbert	Baldwin	17	41	2.4	0	0.00
	Brightwell	16	81	6.8	23	1.28
	Homebell	27	93	1.9	13	0.24
	Tifblue	16	81	6.5	43	2.30
	Woodard	26	65	3.4	27	0.59
Spartan	Baldwin	25	88	7.9	30	2.09
	Brightwell	19	100	6.1	3	0.20
	Homebell	17	71	18.3	20	2.59
	Tifblue	12	100	9.4	27	2.51
	Woodard	13	85	10.2	0	0.00
Weymouth	Baldwin	10	60	12.3	7	0.49
	Brightwell	16	100	6.1	7	0.41
	Homebell	16	88	9.4	6	0.49
	Tifblue	12	75	18.7	7	0.93
	Woodard	31	23	3.3	0	0.00

表3-3 (続き)

交配組合せ		交配花数	結実率 (%)	種子数 /果	発芽率 (%)	実生数 /花
♀	♂					
<i>V. virgatum</i> × <i>V. corymbosum</i>						
Baldwin	Berkeley	23	9	2.0	50	0.09
	Collins	34	71	0.9	59	0.38
	Darrow	42	0	0.0		0.00
	Dixi	23	13	0.3	0	0.00
	Earliblue	22	5	2.0	0	0.00
	Elliott	36	14	0.2	0	0.00
	Flordablue	34	18	0.3	0	0.00
	Herbert	42	24	2.0	67	0.32
	Spartan	44	7	0.3	0	0.00
	Weymouth	19	53	3.6	77	1.45
Brightwell	Berkeley	15	20	11.0	57	1.25
	Collins	- ^b				
	Darrow	19	0	0.0		0.00
	Dixi	20	15	3.3	35	0.18
	Earliblue	19	5	10.0	38	0.20
	Elliott	16	6	5.0	20	0.06
	Flordablue	19	0	0.0		0.00
	Herbert	34	38	4.4	63	1.06
	Spartan	24	46	5.7	43	1.14
	Weymouth	22	18	2.5	40	0.18
Homebell	Berkeley	26	50	0.6	50	0.15
	Collins	34	38	3.8	53	0.78
	Darrow	40	38	1.9	72	0.51
	Dixi	25	20	3.0	0	0.00
	Earliblue	27	33	2.3	70	0.54
	Elliott	25	0	0.0		0.00
	Flordablue	24	4	1.0	0	0.00
	Herbert	36	56	4.1	47	1.05
	Spartan	38	39	4.0	87	1.37
	Weymouth	28	29	1.9	60	0.32
Tifblue	Berkeley	21	52	0.0		0.00
	Collins	38	58	0.2	86	0.09
	Darrow	10	0	0.0		0.00
	Dixi	17	0	0.0		0.00
	Earliblue	38	76	0.0		0.00
	Elliott	37	8	0.7	0	0.00
	Flordablue	32	66	0.0	0	0.00
	Herbert	37	19	0.3	50	0.03
	Spartan	36	58	0.1	50	0.03
	Weymouth	28	0	0.0		0.00
Woodard	Berkeley	21	10	4.0	25	0.10
	Collins	23	30	2.7	57	0.47
	Darrow	30	0	0.0		0.00
	Dixi	19	0	0.0		0.00
	Earliblue	24	21	0.4	25	0.02
	Elliott	33	6	2.0	33	0.04
	Flordablue	24	0	0.0		0.00
	Herbert	28	18	5.4	54	0.52
	Spartan	29	3	1.0	0	0.00
	Weymouth	88	11	1.5	53	0.09

a) 2003年交配(Miyashita et al., 2012)。b) 欠測。

表3-4 ブルーベリー2種間の正逆交配に及ぼす品種の影響

品種	交配組合 せ数	結実率(%)	種子数/果	発芽率(%)	実生数/花
<i>V. corymbosum</i> × <i>V. virgatum</i>					
♀品種(<i>V. corymbosum</i>)					
Berkeley	5	50 ± 15	4.2 ± 1.6	29 ± 12	0.98 ± 0.62
Collins	5	84 ± 13	3.1 ± 0.4	1 ± 1	0.02 ± 0.02
Darrow	5	62 ± 10	3.5 ± 1.2	36 ± 11	0.85 ± 0.55
Dixi	5	54 ± 14	4.6 ± 1.7	46 ± 13	1.64 ± 0.84
Earliblue	5	90 ± 3	12.5 ± 2.8	8 ± 2	0.91 ± 0.30
Elliott	5	65 ± 11	6.7 ± 2.3	54 ± 12	2.31 ± 1.06
Flordablue	5	32 ± 6	2.8 ± 0.5	6 ± 2	0.07 ± 0.03
Herbert	5	72 ± 9	4.2 ± 1.0	21 ± 7	0.88 ± 0.42
Spartan	5	89 ± 5	10.4 ± 2.1	16 ± 6	1.48 ± 0.57
Weymouth	5	69 ± 13	10.0 ± 2.7	5 ± 1	0.46 ± 0.15
		*	*	**	*
♂品種(<i>V. virgatum</i>)					
Baldwin	10	42 ± 9	4.7 ± 1.5	20 ± 9	0.51 ± 0.23
Brightwell	10	81 ± 6	7.8 ± 1.3	22 ± 7	1.35 ± 0.48
Homebell	10	74 ± 7	7.2 ± 1.9	16 ± 5	1.28 ± 0.64
Tifblue	10	78 ± 7	7.7 ± 1.9	29 ± 9	1.35 ± 0.36
Woodard	10	57 ± 10	3.7 ± 0.8	23 ± 8	0.31 ± 0.11
		*	ns	ns	ns
<i>V. virgatum</i> × <i>V. corymbosum</i>					
♀品種(<i>V. virgatum</i>)					
Baldwin	10	21 ± 7	1.2 ± 0.4	28 ± 11	0.22 ± 0.14
Brightwell	10	17 ± 5	4.7 ± 1.3	42 ± 5	0.45 ± 0.18
Homebell	10	31 ± 6	2.3 ± 0.5	49 ± 10	0.47 ± 0.15
Tifblue	10	34 ± 10	0.1 ± 0.1	37 ± 17	0.01 ± 0.01
Woodard	10	10 ± 3	1.7 ± 0.6	35 ± 8	0.12 ± 0.06
		ns	**	ns	ns
♂品種(<i>V. corymbosum</i>)					
Berkeley	5	28 ± 10	3.5 ± 2.0	45 ± 7	0.32 ± 0.23
Collins	4	49 ± 9	1.9 ± 0.8	64 ± 7	0.43 ± 0.14
Darrow	5	8 ± 8	0.4 ± 0.4	72	0.10 ± 0.10
Dixi	5	10 ± 4	1.3 ± 0.8	12 ± 12	0.04 ± 0.04
Earliblue	5	28 ± 13	2.9 ± 1.8	33 ± 15	0.15 ± 0.10
Elliott	5	7 ± 2	1.6 ± 0.9	13 ± 8	0.02 ± 0.01
Flordablue	5	17 ± 12	0.3 ± 0.2	0 ± 0	0.00 ± 0.00
Herbert	5	31 ± 7	3.2 ± 0.9	56 ± 4	0.60 ± 0.20
Spartan	5	31 ± 11	2.2 ± 1.1	36 ± 16	0.51 ± 0.31
Weymouth	5	22 ± 9	1.9 ± 0.6	57 ± 8	0.41 ± 0.27
		*	ns	**	*

表中の値は平均値±標準誤差。

^{ns} 有意差なし, * 5%の危険率で有意差あり, ** 1%の危険率で有意差あり (Kruskal Wallis順位検定)。

表3-5 ブルーベリー2種間の正逆交配における結実率, 種子数および発芽率

交配組合せ	交配 組合せ数	結実率(%)	種子数/果	発芽率(%)	実生数/花
<i>V. corymbosum</i> × <i>V. virgatum</i>	50	67 ± 4	6.2 ± 0.7	22 ± 3	0.96 ± 0.19
<i>V. virgatum</i> × <i>V. corymbosum</i>	49	23 ± 3	1.9 ± 0.4	38 ± 5	0.25 ± 0.06
		**	**	*	**

表中の値は平均値±標準誤差。

* 5%の危険率で有意差あり, ** 1%の危険率で有意差あり(Mann-Whitney順位和検定)。

表3-6 ブルーベリー種と *Vaccinium* 属野生種等との正逆交配における結実率, 種子数および発芽率^a

交配組合せ		A×B					B×A				
ブルーベリー種 (A)	野生種等 (B)	交配 花数	結実率 (%)	種子数 /果	発芽率 (%)	実生数 /花	交配 花数	結実率 (%)	種子数 /果	発芽率 (%)	実生数 /花
<i>V. corymbosum</i>	<i>V. boninense</i>	529	45.2	0	-	0	1194	0.2	0.50	100	0.001
	<i>V. wrightii</i>	119	21.8	0	-	0	182	0	-	-	0
	<i>V. bracteatum</i>	79	27.8	0	-	0	189	0	-	-	0
	<i>V. oldhamii</i>	74	12.2	0.11	100	0.014	88	13.6	3.33	0	0
	<i>V. darrowi</i>	37	43.2	0	-	0	39	5.1	0	-	0
	TO-303	121	18.2	0	-	0	169	53.8	0.04	25	0.006
<i>V. virgatum</i>	<i>V. boninense</i>	687	19.8	0.11	0	0	534	0.2	1.00	0	0
	<i>V. wrightii</i>	184	9.8	0	-	0	157	0	-	-	0
	<i>V. bracteatum</i>	80	53.8	0	-	0	192	1.0	0	-	0
	<i>V. oldhamii</i>	95	6.3	0	-	0	212	4.2	4.33	0	0
	<i>V. darrowi</i>	40	47.5	0	-	0	41	4.9	0	-	0
	TO-303	138	6.5	0	-	0	261	25.7	0.18	0	0

a) 2003~2007, 2012~2013年の交配結果をまとめた。

表3-7 *Vaccinium*属の野生種・種間雑種間の正逆交配における結実率，種子数および発芽率^a

交配組合せ		A×B					B×A				
(A)	(B)	交配 花数	結実率 (%)	種子数 /果	発芽率 (%)	実生数 /花	交配 花数	結実率 (%)	種子数 /果	発芽率 (%)	実生数 /花
<i>V. boninense</i>	<i>V. wrightii</i>	165	35.8	13.46	39	1.861	175	23.4	3.32	33	0.257
<i>V. boninense</i>	<i>V. bracteatum</i>	173	14.5	7.20	92	0.954	56	10.7	0.50	100	0.054
<i>V. boninense</i>	<i>V. oldhamii</i>	176	0	-	-	0	62	0	-	-	0
<i>V. boninense</i>	<i>V. darrowi</i>	46	0	-	-	0	31	16.1	0	-	0
<i>V. boninense</i>	TO-303	52	0	-	-	0	118	89.0	0.50	25	0.110
<i>V. wrightii</i>	<i>V. bracteatum</i>	36	0	-	-	0	40	22.5	0.11	100	0.025
<i>V. wrightii</i>	<i>V. oldhamii</i>	17	0	-	-	0	20	0	-	-	0
<i>V. wrightii</i>	<i>V. darrowi</i>	36	0	-	-	0	17	17.6	0	-	0
<i>V. wrightii</i>	TO-303	61	0	-	-	0	66	98.5	1.58	5	0.076
<i>V. bracteatum</i>	<i>V. oldhamii</i>	96	2.1	0	-	0	19	0	-	-	0
<i>V. bracteatum</i>	<i>V. darrowi</i>	17	41.2	0	-	0	31	0	-	-	0
<i>V. bracteatum</i>	TO-303	81	19.8	0	-	0	19	78.9	0	-	0
<i>V. oldhamii</i>	<i>V. darrowi</i>	19	0	-	-	0	46	21.7	0	-	0
<i>V. oldhamii</i>	TO-303	28	0	-	-	0	53	83.0	0.52	22	0.094
<i>V. darrowi</i>	TO-303	20	0	-	-	0	19	94.7	0	-	0

a) 2003～2007, 2012～2013年の交配結果をまとめた。

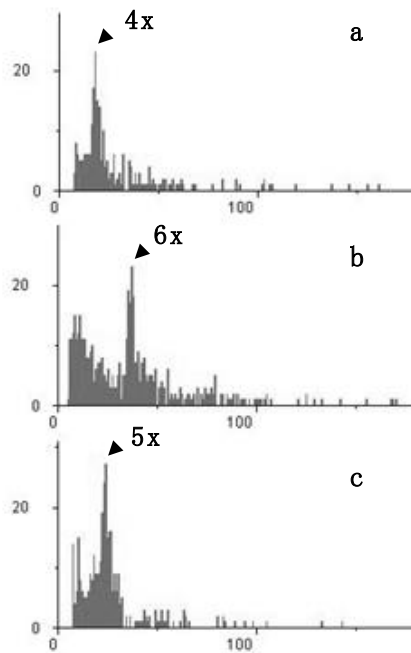


図3-1 フローサイトメトリーによるブルーベリー種間交雑実生の倍数性レベルの解析

- a) *V. corymbosum* (4x)
- b) *V. virgatum* (6x)
- c) *V. corymbosum* × *V. virgatum* (5x)

表3-8 *Vaccinium*属の交雑実生の倍数性レベルおよび雑種性の評価

交配組合せ		個体数	倍数性 レベル	雑種性 ^a
♀	♂			
ブルーベリーと野生種・種間雑種間の交雑実生				
TO-303 (2x)	<i>V. corymbosum</i> (4x)	1	4x	○
<i>V. boninense</i> (2x)	<i>V. corymbosum</i> (4x)	1 ^b	-	-
<i>V. corymbosum</i> (4x)	<i>V. oldhamii</i> (2x)	1	4x	×
野生種・種間雑種間の交雑実生				
TO-303 (2x)	<i>V. boninense</i> (2x)	2	2x	○
TO-303 (2x)	<i>V. wrightii</i> (2x)	1	2x	○
TO-303 (2x)	<i>V. oldhamii</i> (2x)	4	2x	○
<i>V. boninense</i> (2x)	<i>V. wrightii</i> (2x)	8	2x	○
<i>V. wrightii</i> (2x)	<i>V. boninense</i> (2x)	1	2x	○
<i>V. boninense</i> (2x)	<i>V. bracteatum</i> (2x)	3	2x	○
<i>V. bracteatum</i> (2x)	<i>V. boninense</i> (2x)	1	2x	○
<i>V. bracteatum</i> (2x)	<i>V. wrightii</i> (2x)	1 ^b	-	-

a) ○:雑種である, ×:雑種ではない, -:不明。b) 発芽後早期に枯死したため未調査。

表3-9 *Vaccinium*属の交雑実生およびその両親個体のSSR遺伝子型^a

マーカー名・ アレルサイズ(bp)	<i>V. boninense</i> × <i>V. wrightii</i>			<i>V. boninense</i> × <i>V. bracteatum</i>			TO-303 × <i>V. corymbosum</i>			TO-303 × <i>V. boninense</i>			TO-303 × <i>V. oldhamii</i>			
	♀	♂	F ₁	♀	♂	F ₁ ^b	♀	♂	F ₁	♀	♂	F ₁	♀	♂	F ₁ ^b	
	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	4x	4x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	
CA23F	156						●	■	▲	●			●		●	
	159					●		■	■						■	■
	168	●	■	▲	●		●					■	■			
	174		■			■	■									
CA112F	145							■	■							
	147						●		●	●		●		●	●	
	151							■	■							
	172					■	■							■	■	
	174	●		●	●		●				■					
	176		■	■								■				
	180	●			●						■					
	186					■										
CA794F	219													■	■	
	225													■		
	227							■	■							
	229		■													
	231	●			●		●		■			■				
	233					■										
	239							●	●	●		●	●	●	●	
	241	●		●	●	■	■					■	■			
245		■	■													
CA855F	233		■			■										
	235	●		●	●			■	■		■	■		●		
	237							●	●		●	●		●		
	238								■							
	239							●	●		●			●		
	242														■	
	243														■	
	245		■	■												
	247	●			●							■				
	248					■										
251								■								
253								■	■							
GVCO001	158						●	■	▲	●			●		●	
	164		■	■												
	165													■	■	
	166	●		●	●	■	▲				■					
	170														■	
	172	●			●							■	■			
	180					■										
	192								■	■						

a) 一部個体のデータを抜粋して示した。♀・♂・F₁の下に数値は倍数性レベルを示す。表中の記号は、アレルが検出されたことを示す。F₁個体では、●は♀由来、■は♂由来、▲は♀♂のどちら由来か不明のアレルを意味する。b) CA855Fは欠測。

雑種 TO-303×*V. corymbosum* 1 個体 (個体名 TEa-1) については、種子親が2倍体であるにも関わらず4倍体であった。SSR多型解析では、種子親が2本のアリルをもつマーカーにおいて、TEa-1はいずれも同じ2本のアリルを受け継いでいた。このことから、TEa-1はTO-303の非還元卵(2n)と*V. corymbosum*の雄性配偶子(2n)との接合により生じた個体であることが明らかとなった。

3.3.3 交雑能力の評価

Vaccinium 属8種類間の正逆交配における交雑能力の程度を、交配1花あたりの実生数に基づいて「無」から「高」までの5段階で評価し、各パラメーター値(結実率、1果あたりの種子数、発芽率)とともに表3-10にまとめた。その結果、*Cyanococcus* 節内の倍数体種間および*Bracteata* 節内の2倍体種間では交雑能力が「中」または「低」の組合せが多く、比較的雑種を得やすかった(表3-10(4))。一方、同節でも倍数性レベルが大きく異なる組合せ(倍数体と2倍体)、倍数性レベルが同じでも節が異なる組合せおよびブルーベリーと日本の2倍体野生種のように倍数性レベルも節も異なる組合せでは、交雑能力はほぼ全てが「無」であり、雑種は得られなかった。ただし、TO-303を種子親に用いた場合には、異なる節や異なる倍数性レベルの種とも雑種を得ることができた。

正逆交配における個々のパラメーター値について種子親別の傾向をみると(表3-10(1)~(3))、*V. corymbosum* および TO-303 では、結実率が40%以上と高い組合せが他種に比べて多かった。しかし、結実率の高い組合せでも1果あたりの種子数はほとんどが0個であった。*V. oldhamii* は、結実率は総じて低いものの、ブルーベリー2種との交配では1果あたりの種子数が3.3~4.3個と、他の野生種とブルーベリー種間の交配組合せに比べて顕著に多かった。しかし、これらの種子はいずれも発芽しなかった。*V. darrowi* は総じて結実率が低く、また、いずれの組合せでも種子を得ることができなかった。

3.3.4 雑種の外部形態等の評価

雑種性を確認できた個体の多くは、順化、鉢上げの後に温室で順調に生育した。3年生以上に生育した雑種個体について、外部形態等の特性を調査した。

ブルーベリー2種間の雑種7個体(*V. corymbosum* 'Eliot' × *V. virgatum* 'Tifblue' 4個体、*V. corymbosum* 'Spartan' × *V. virgatum* 'Homebell' 3個体)では、果実の重量が、両親品種の1.24~2.22gに比べて概ね軽い傾向であった(表3-11)。しかし、EITi-6では1.12gと比較的重く、個体間差が大きかった。種間雑種の果粉は弱~中と総じて少なく、果皮が黒色を呈する傾向であった。収穫時期は、

概ね両親品種の中間的か、*V. virgatum*と同様に晩生であった。

雑種の TO-303×*V. corymbosum* (個体名 TEa-1) では、果実、花などの各器官の形態については、概ね両親の中間的であった(表3-12)。TEa-1の果実サイズは、種子親 TO-303に比べて顕著に大きく、果粉が弱であるため果皮は黒色を呈した(図版3-2)。また、果肉は白く、収穫時期は早生であり、花粉親の*V. corymbosum*に近い性質を示した。

雑種の TO-303×*V. oldhamii* 3個体(個体名 TN-1, TN-3, TN-5)では、いずれも花粉親の*V. oldhamii*と同様に、収穫時期は10~11月と晩生であった(表3-13)。また、果肉は紫色を呈し、花粉親と同様に果実のアントシアニン含量が高いことが示唆された。果実や葉の大きさ、花の形態などについては個体間差が大きかった(図版3-3)。

雑種の TO-303×*V. boninense* 2個体(個体名 TM-1, TM-2)では、どちらも種子親 TO-303と同様に果肉が薄紫色を呈し、果実サイズが小さく、収穫時期は両親の中間的であった(表3-14, 図版3-4)。また、雑種の花はどちらも、花粉親の*V. boninense*と同様に冬から春にかけて長期に咲く性質があり、香りをやや有していた。

3.3.5 雑種の稔性の評価

ブルーベリー2種間の5倍体雑種7個体について、稔性および交雑能力を評価するために交配試験を行った。自殖交配では3個体が結実したものの、いずれも種子は得られなかった(表3-15)。また、*V. corymbosum* および *V. virgatum* との正逆戻し交配では、計28組合せのうち2組合せで種子が得られ、EITi-3×*V. virgatum*の1組合せでのみ交雑実生が得られた。交配1花あたりの実生数は0.09個で、交雑能力は「低」であった。なお、EITi-1は、種子親に用いた場合の交配において結実率が43~100%と高く、単為結果性を有することが示唆された。

雑種 TEa-1 (TO-303×*V. corymbosum*) は、自殖交配で1花あたり0.58個の実生を得ることができた(表3-16)。また、*V. corymbosum* との正逆戻し交配では、計4組合せのいずれにおいても交雑実生が得られた。交配1花あたりの実生数は1.11~9.74個で、交雑能力は「中~高」であった。このように、TEa-1は自殖稔性があり、また、*V. corymbosum* との戻し交配では種子親と花粉親のどちらに用いても交雑能力が比較的高いことが明らかとなった。

雑種の TO-303×*V. oldhamii* 3個体(個体名 TN-1, TN-3, TN-5)は、自殖交配ではTN-1のみ結実したが、種子は得られなかった(表3-17)。また、*V. corymbosum* および *V. virgatum* との正逆交配では、計24組合せのうち1組合

表3-10 *Vaccinium*属8種類間の正逆交配における交雑能力の評価

(1) 結実率

単位:%

♀ \ ♂	<i>Cyanococcus</i>				<i>Ciliata</i>	<i>Bracteata</i>		
	<i>V. corymbosum</i> 4x	<i>V. virgatum</i> 6x	<i>V. darrowi</i> 2x	TO-303 2x	<i>V. oldhamii</i> 2x	<i>V. boninense</i> 2x	<i>V. wrightii</i> 2x	<i>V. bracteatum</i> 2x
<i>V. corymbosum</i>	-	67	43	18	12	45	22	28
<i>V. virgatum</i>	23	-	48	7	6	20	10	54
<i>V. darrowi</i>	5	5	-	0	22	16	18	0
TO-303	54	26	95	-	83	89	98	79
<i>V. oldhamii</i>	14	4	0	0	-	0	0	0
<i>V. boninense</i>	0	0	0	0	0	-	36	14
<i>V. wrightii</i>	0	0	0	0	0	23	-	0
<i>V. bracteatum</i>	0	1	41	20	2	11	23	-

(2) 1果あたりの種子数

単位:/果

♀ \ ♂	<i>Cyanococcus</i>				<i>Ciliata</i>	<i>Bracteata</i>		
	<i>V. corymbosum</i> 4x	<i>V. virgatum</i> 6x	<i>V. darrowi</i> 2x	TO-303 2x	<i>V. oldhamii</i> 2x	<i>V. boninense</i> 2x	<i>V. wrightii</i> 2x	<i>V. bracteatum</i> 2x
<i>V. corymbosum</i>	-	6.2	0.0	0.0	0.0 ^a	0.0	0.0	0.0
<i>V. virgatum</i>	1.9	-	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0
<i>V. darrowi</i>	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	-
TO-303	0.0	0.2	0.0	-	0.5	0.5	1.6	0.0
<i>V. oldhamii</i>	3.3	4.3	-	-	-	-	-	-
<i>V. boninense</i>	0.5	1.0	-	-	-	-	13.5	7.2
<i>V. wrightii</i>	-	-	-	-	-	3.3	-	-
<i>V. bracteatum</i>	-	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.1	-

表中の - は結実しなかった組合せを示す。^a 種子1個が得られたが、発芽実生は雑種でなかったため個数に含めない。

(3) 発芽率

単位:%

♀ \ ♂	<i>Cyanococcus</i>				<i>Ciliata</i>	<i>Bracteata</i>		
	<i>V. corymbosum</i> 4x	<i>V. virgatum</i> 6x	<i>V. darrowi</i> 2x	TO-303 2x	<i>V. oldhamii</i> 2x	<i>V. boninense</i> 2x	<i>V. wrightii</i> 2x	<i>V. bracteatum</i> 2x
<i>V. corymbosum</i>	-	22	-	-	-	-	-	-
<i>V. virgatum</i>	38	-	-	-	-	0	-	-
<i>V. darrowi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
TO-303	25	0	-	-	22	25	5	-
<i>V. oldhamii</i>	0	0	-	-	-	-	-	-
<i>V. boninense</i>	100	0	-	-	-	-	39	92
<i>V. wrightii</i>	-	-	-	-	-	33	-	-
<i>V. bracteatum</i>	-	-	-	-	-	100	100	-

表中の - は種子が得られなかった組合せを示す。

(4) 交雑能力

♀ \ ♂	<i>Cyanococcus</i>				<i>Ciliata</i>	<i>Bracteata</i>		
	<i>V. corymbosum</i> 4x	<i>V. virgatum</i> 6x	<i>V. darrowi</i> 2x	TO-303 2x	<i>V. oldhamii</i> 2x	<i>V. boninense</i> 2x	<i>V. wrightii</i> 2x	<i>V. bracteatum</i> 2x
<i>V. corymbosum</i>	-	◎	×	×	×	×	×	×
<i>V. virgatum</i>	○	-	×	×	×	×	×	×
<i>V. darrowi</i>	×	×	-	×	×	×	×	×
TO-303	△	×	×	-	○	○	○	×
<i>V. oldhamii</i>	×	×	×	×	-	×	×	×
<i>V. boninense</i>	△ ^a	×	×	×	×	-	◎	◎
<i>V. wrightii</i>	×	×	×	×	×	○	-	×
<i>V. bracteatum</i>	×	×	×	×	×	○	△ ^a	-

交雑能力は「交配1花あたりの実生数」に基づいて相対評価し、5.00個以上では高(●)、0.50個以上では中(◎)、0.05個以上では低(○)、0.05個未満では極低(△)、0個では無(×)、と判定した。a) 発芽後早期に枯死したため雑種性は未確認。

表3-11 種間雑種 *V. corymbosum* × *V. virgatum* の形態等の評価^a

交配組合せ・個体名	倍数性 レベル	葉身長 (mm)	葉身幅 (mm)	葉柄長 (mm)	花冠長 (mm)	花冠幅 (mm)	花柄長 (mm)	花色
Eliot × Tifblue								
♀ Eliot	4x	65.0	35.6	3.9	9.3	7.0	5.7	白～淡桃
EITi-1		50.6	31.8	2.9	9.7	6.0	4.9	白～淡桃
F ₁ EITi-3	5x	44.2	24.4	2.7	10.0	6.4	4.8	白～淡桃
EITi-6		44.0	22.4	3.4	10.0	7.3	6.2	白～淡桃
EITi-9		53.8	25.8	3.9	9.7	7.0	5.5	白～淡桃
♂ Tifblue	6x	53.6	24.0	2.7	10.6	5.7	8.4	白～淡桃
Spartan × Homebell								
♀ Spartan	4x	72.4	36.8	4.4	9.2	10.1	6.3	白
SpHo-S65G-2		66.6	25.4	2.9	6.8	5.5	6.4	白～淡桃
F ₁ SpHo-S65G-3	5x	56.8	31.0	3.6	7.0	5.1	4.7	白～淡桃
SpHo-S65G-8		63.6	38.0	3.7	10.2	8.0	11.6	白～淡桃
♂ Homebell	6x	56.9	31.9	1.8	10.0	6.9	6.56	白
交配組合せ・個体名	開花期	がくあ の深さ	果実重(g)	果実縦 径(mm)	果実横 径(mm)	果粉	果肉色	収穫時期
Eliot × Tifblue								
♀ Eliot	4～5月	深	1.24	10.2	14.2	強	白	7月
EITi-1	4月	中	0.60	8.8	11.0	弱	白	8月
F ₁ EITi-3	4月	中	0.80	9.6	12.0	弱	白	7月
EITi-6	4月	浅	1.12	10.0	13.5	弱	白～淡紫	7月
EITi-9	4～5月	中	0.75	8.1	12.0	中	白	7～8月
♂ Tifblue	4～5月	浅	1.24	10.2	14.2	強	白	7～8月
Spartan × Homebell								
♀ Spartan	4月	中	2.22	12.4	17.5	強	白	6月
SpHo-S65G-2	4～5月	深	0.29	6.6	7.4	弱	淡紫	8月
F ₁ SpHo-S65G-3	4月	中	0.27	6.3	8.4	弱	淡紫	8月
SpHo-S65G-8	4月	深	0.75	9.3	11.7	弱	白	8月
♂ Homebell	4～5月	中	1.21	10.7	12.4	中	白～淡紫	7～8月

a) 2014年, 11年生苗を調査した。

表3-12 雑種T0-303 × *V. corymbosum* の形態等の評価^a

種・個体	倍数性	葉形	葉身長 (mm)	葉身幅 (mm)	葉柄長 (mm)	花冠長 (mm)	花冠幅 (mm)	花柄長 (mm)
♀ TO-303	2x	長楕円形	23.8	7.8	1.9	5.8	4.1	4.9
F ₁ TEa-1	4x	楕円形	46.4	20.6	1.9	7.8	7.1	3.6
♂ <i>V. corymbosum</i> ^b	4x	楕円形	77.2	42.2	4.2	10.5	7.9	6.2

種・個体	開花期	果形	果実重(g)	果実縦径 (mm)	果実横径 (mm)	果粉	果肉色	収穫時期
♀ TO-303	4~5月	楕円	0.17	8.2	6.6	極弱	淡紫	7~8月
F ₁ TEa-1	4月	円	1.15	12.6	12.7	弱	白	6月
♂ <i>V. corymbosum</i> ^b	4月	偏円	1.88	11.2	15.2	強	白	6月

a) 2013年, 9年生苗を調査した。b) 'Earliblue'

表3-13 雑種T0-303 × *V. oldhamii* の形態等の評価^a

種・個体	倍数性	葉形	葉身長 (mm)	葉身幅 (mm)	花冠の形	花冠長 (mm)	花冠幅 (mm)	花柄長 (mm)
♀ TO-303	2x	長楕円形	23.8	7.8	つぼ形	5.8	4.1	4.9
TN-1	2x	楕円形	24.4	9.6	鐘形	5.6	3.7	2.9
F ₁ TN-3	2x	楕円形	22.6	10.6	鐘形	5.9	3.8	3.1
TN-5	2x	楕円形	30.8	13.6	つぼ形	6.1	4.9	4.4
♂ <i>V. oldhamii</i>	2x	楕円形	60.8	28.6	鐘形	4.9	4.8	2.6

種・個体	開花期	果形	果実重(g)	果実縦径 (mm)	果実横径 (mm)	果粉	果肉色	収穫時期
♀ TO-303	4~5月	楕円形	0.17	8.2	6.6	極弱	淡紫	7~8月
TN-1	5月	円形	0.10	5.8	5.4	極弱	紫	10~11月
F ₁ TN-3	5月	円形	0.08	5.3	5.2	極弱	紫	10~11月
TN-5	5月	円形	0.17	6.4	6.7	極弱	紫	10~11月
♂ <i>V. oldhamii</i>	6月	円形	0.60	10.3	10.3	極弱	紫	10~11月

a) 2012年, 9年生苗を調査した。

表3-14 雑種TO-303 × *V. boninense* の形態等の評価^a

種・個体	倍数性	葉形	葉身長 (mm)	葉身幅 (mm)	葉柄長 (mm)	花冠長 (mm)	花冠幅 (mm)	花柄長 (mm)
♀ TO-303	2x	長楕円形	23.8	7.8	1.9	5.8	4.1	4.9
F ₁	TM-1	長円形	34.0	15.4	1.8	9.4	5.1	18.3
	TM-2	楕円形	31.8	18.0	2.1	8.0	4.6	7.2
♂ <i>V. boninense</i>	2x	楕円形	37.2	19.0	3.0	9.5	5.9	6.1

種・個体	花の香り	開花期	果実重(g)	果実縦径 (mm)	果実横径 (mm)	果粉	果肉色	収穫時期
♀ TO-303	無し	4~5月	0.17	8.2	6.6	極弱	淡紫	7~8月
F ₁	TM-1	やや有り	0.16	6.3	6.7	極弱	淡紫	11~1月
	TM-2	やや有り	0.15	5.9	6.4	極弱	淡紫	9~10月
♂ <i>V. boninense</i>	有り	1~5月	0.52	9.3	9.8	極弱	白	12~1月

a) 2014年, 7年生苗を調査した。

せで種子が得られたが、交雑実生は得られなかった。なお、TN-1は、種子親に用いた場合の交配で結実率が11~48%と安定して結実し、単為結果性を有することが示唆された。

3.4 考察

(1) 正逆交配における交雑能力の評価

ブルーベリーと日本在来野生種を含めた *Vaccinium* 属 8種類間で総当たりの正逆交配を行った結果、以下のことが明らかとなった。すなわち、①ブルーベリーと日本の2倍体野生種4種との交雑能力は著しく低く、雑種を得ることは困難であった。②同節内の倍数性レベルが近い種間では比較的雑種を得やすかった。③TO-303は種子親とした場合に異なる節や異なる倍数性の種との交雑能力を有していた。

特筆すべきは、TO-303のように、倍数性や節を超えて広い交雑能力を有するユニークな素材があることが明らかとなったことである。一般に、倍数性や節の異なる種間での交雑は困難であり、*Vaccinium* 属においてもそうであることが予想されたが、本論文ではそのことが明確に確認された。一方、TO-303は、種子親の *V. darrowi* と同じく非還元配偶子を形成することができ、このことが倍数性レベルの異なる交配の成功に寄与していた。したがって、TO-303の広い交雑能力の一端は *V. darrowi* に由来すると考えられる。しかし、節を超えた交雑については、*V. darrowi* よりもTO-303のほうが成功しており、この交雑能力がどこに由来するのかわからない。ただし、本章で用いた *V. darrowi* の品種 'Native blue' については、

種内交配試験が実施できなかったために正常な稔性を有するかどうかを確認できておらず(表3-2)、また、SHBの育成母本となった Florida 4Bなどの個体に比べて種間交雑の能力が低いという可能性はある。TO-303と *V. darrowi* の交雑能力の関係性についてはさらに詳細な調査が必要である。

(2) 交雑能力に影響する要因の解析

本章では、遺伝的類縁関係が遠い種間や倍数性レベルが異なる種間では雑種作出が著しく困難であることを確認した。それでは、類縁関係と倍数性レベルとではどちらがより大きな交雑の障壁となり得るだろうか。日本の野生種のうち、これまでにブルーベリーとの種間雑種作出の報告があるのは、*V. uliginosum* (執行ら, 2014)、*V. smallii* (Ehlenfeldt and Ballington, 2012)、*V. bracteatum* (Tsuda et al., 2013)の3種である。第3章の樹形図に基づく推定では、ブルーベリーとの類縁関係は *V. uliginosum*、*V. smallii* では相対的に近く、*V. bracteatum* では遠かった。次に倍数性レベルをみると、*V. uliginosum* および *V. smallii* は4倍性以上の倍数体種であり、2倍体の *V. bracteatum* についてはコルヒチン処理で作出された4倍体を用いることで雑種が得られている (Tsuda et al., 2013)。また、本章で用いた日本の野生種4種はいずれもブルーベリーと交雑できなかったが、3章の樹形図からブルーベリーとの類縁関係を推定すると、*V. oldhamii* は比較的近く、他の3種は遠い。倍数性レベルについては全て2倍体種である。以上のことから、ブルーベリーと日本在来野生種の種間交雑の成否には、類縁関係の遠近

表3-15 種間雑種 *V. corymbosum* × *V. virgatum* の稔性評価^a

交配組合せ		交配 花数	結実率 (%)	種子数 /果	発芽率 (%)	実生数 /花
♀	♂					
自殖交配						
EITi-1		21	100	0.0		0
EITi-3		18	17	0.0		0
EITi-6		20	0			0
EITi-9		18	0			0
SpHo-S65G-2		- ^b				-
SpHo-S65G-3		21	0			0
SpHo-S65G-8		20	45	0.0		0
<i>V. corymbosum</i> (Berkeley)との正逆交配						
EITi-1	Berkeley	19	89	0.2	0	0
Berkeley	EITi-1	18	0			0
EITi-3	Berkeley	21	24	0.0		0
Berkeley	EITi-3	16	81	0.0		0
EITi-6	Berkeley	19	0			0
Berkeley	EITi-6	16	75	0.0		0
EITi-9	Berkeley	22	64	0.0		0
Berkeley	EITi-9	16	0			0
SpHo-S65G-2	Berkeley	22	0			0
Berkeley	SpHo-S65G-2	- ^b				-
SpHo-S65G-3	Berkeley	22	0			0
Berkeley	SpHo-S65G-3	17	29	0.0		0
SpHo-S65G-8	Berkeley	19	11	0.0		0
Berkeley	SpHo-S65G-8	15	0			0
<i>V. virgatum</i> (Brightwell)との正逆交配						
EITi-1	Brightwell	21	43	0.0		0
Brightwell	EITi-1	16	50	0.0		0
EITi-3	Brightwell	22	5	2.0	100	0.09
Brightwell	EITi-3	19	89	0.0		0
EITi-6	Brightwell	21	0			0
Brightwell	EITi-6	16	50	0.0		0
EITi-9	Brightwell	22	45	0.0		0
Brightwell	EITi-9	20	0			0
SpHo-S65G-2	Brightwell	22	0			0
Brightwell	SpHo-S65G-2	- ^b				-
SpHo-S65G-3	Brightwell	21	0			0
Brightwell	SpHo-S65G-3	17	0			0
SpHo-S65G-8	Brightwell	20	30	0.0		0
Brightwell	SpHo-S65G-8	20	55	0.0		0

a) 2013年に交配を行った。b) SpHo-S65G-2の花粉量が著しく少なかったため、交配できなかった。

表3-16 雑種TO-303×*V. corymbosum* (TEa-1) の稔性評価^{a)}

交配組合せ		交配 花数	結実率 (%)	種子数 /果	発芽率 (%)	実生数 /花
♀	♂					
自殖交配						
TEa-1		31	52	1.8	62.1	0.58
<i>V. corymbosum</i> との正逆交配						
TEa-1	Coville	41	71	4.1	86.6	2.51
Coville	TEa-1	39	74	2.5	87.7	1.64
TEa-1	Bluecrop	62	76	15.2	84.4	9.74
Bluecrop	TEa-1	18	89	1.4	87.0	1.11

a) 2012年に交配を行った。

よりも倍数性レベルの相違が大きく影響することが示唆される。

次に、正逆交配における個々のパラメーター値を種子親別に評価し、そこから見出される傾向をもとに、各々の種または種間雑種の特性や交雑能力について考察してみたい。まず、*V. corymbosum* および TO-303 では、他種に比べて結実率は総じて高かったものの、いずれも種子数は著しく少なかったことから(表3-2, 表3-10)、単為結果性が強いことが示唆された。また、*V. oldhamii* は、ブルーベリー2種との交配では比較的多くの種子が得られたが、いずれも発芽しなかった(表3-10)。*V. oldhamii* は、予備調査では他の野生種に比べて種子の休眠性が強かったため(データ未掲載)、催芽のための種子への低温処理は6ヵ月と長期に設定したが、この処理では低温打破に不十分だった可能性がある。*V. oldhamii* では、種子の処理条件を再検討することで種間雑種個体が得られるかもしれない。*V. darrowi* については、本章ではいずれの交配組合せでも種子を得ることができなかった。ただし、*V. darrowi* の供試品種‘Native Blue’では、正常な稔性の有無について未確認であることから(表3-2)、種間交配における*V. darrowi* の交雑能力については追加の検証が必要である。

(3) 雑種性判定における SSR マーカーの有効性

本章では、交雑実生の雑種性を評価するために、第3章でシングルローカスと確認された9種類のSSRマーカーを用いた。その結果、22個体中の21個体は雑種で、1個体は雑種でないことを明確に判定でき、雑種性判定におけるこれらのSSRマーカーの有効性を確認できた。Tsuda et al. (2013) は、*V. bracteatum* (4x) × *V. corymbosum* の交配で得られた多くの交雑実生の中から、落葉性を示す個体を推定雑種として選抜した。しかし、表現型による選抜では、全ての実生苗を観察すべきステージまで栽

培しなければならず、また、多くの交雑実生の中から真の雑種個体を正確にスクリーニングするのは容易ではない。さらに、交配組合せによっては、表現型だけで雑種性を判定することは困難である。一方、SSR多型解析は、5mm角程度の新葉が採取できればよく、発芽して間もない若い実生苗でも雑種性の評価は十分に可能である。SSRマーカーは、多くの実生苗の中から迅速かつ正確に雑種個体を選抜する際に有効な手段となるだろう。

また、雑種TEa-1 (TO-303×*V. corymbosum*) は、SSR多型解析により、種子親TO-303の非還元卵(2n)由来の4倍体であることが明らかとなった。SSRマーカーは、雑種のゲノム構成を評価するうえでも有効なツールになると考えられる。

(4) 作出された雑種の評価

本論文で作出された雑種個体は、日本の野生種やブルーベリーの持つ有用形質を受け継いでいれば、ブルーベリーの新たな育種素材として有望である。まず、*V. corymbosum* と *V. virgatum* の5倍体雑種についてみると、Vorsa et al. (1987) の報告と同様に、稔性が著しく低いことが判明した。しかし、一部の雑種個体は、戻し交雑で稔性を有することが確認できた。ブルーベリー2種の交雑は、*V. corymbosum* のもつ優れた果実品質と *V. virgatum* のもつ温暖地適応性や晩生性を兼ね備えた品種を開発する上で魅力的な組合せである。雑種個体は、収穫時期がいずれも両親種の中間的か晩生の傾向であったことから、*V. corymbosum* より晩生で梅雨以降に収穫できる雑種個体を得ることは容易である。雑種の果実については、概ね両親品種より小さい傾向となったものの個体間差が大きく、また、単為結果性を示す個体もあった。5倍体雑種については、*V. virgatum* と同程度の高pH土壌適応性(宮下・石川, 2008)を有する個体を選抜できることが報告されている。したがって、大規模な5倍体雑種集団

表3-17 雑種T0-303× *V. oldhamii* (TN-1, 3, 5) の稔性評価^a

交配組合せ		交配 花数	結実率 (%)	種子数 /果	発芽率 (%)	実生数 /花
♀	♂					
自殖交配						
TN-1		19	11	0.0	-	0.0
TN-3		21	0	-	-	0.0
TN-5		19	0	-	-	0.0
<i>V. corymbosum</i> との正逆交配						
TN-1	Berkeley	20	25	0.0	-	0.0
Berkeley	TN-1	15	0	-	-	0.0
TN-1	Spartan	21	24	0.0	-	0.0
Spartan	TN-1	18	100	0.0	-	0.0
TN-3	Berkeley	20	0	-	-	0.0
Berkeley	TN-3	15	13	0.0	-	0.0
TN-3	Spartan	21	0	-	-	0.0
Spartan	TN-3	17	41	0.0	-	0.0
TN-5	Berkeley	21	0	-	-	0.0
Berkeley	TN-5	15	0	-	-	0.0
TN-5	Spartan	20	0	-	-	0.0
Spartan	TN-5	16	100	0.0	-	0.0
<i>V. virgatum</i> との正逆交配						
TN-1	Brightwell	20	15	0.0	-	0.0
Brightwell	TN-1	14	0	-	-	0.0
TN-1	Tifblue	21	48	0.0	-	0.0
Tifblue	TN-1	20	25	0.2	0.0	0.0
TN-3	Brightwell	22	0	-	-	0.0
Brightwell	TN-3	17	0	-	-	0.0
TN-3	Tifblue	22	0	-	-	0.0
Tifblue	TN-3	19	47	0.0	-	0.0
TN-5	Brightwell	21	0	-	-	0.0
Brightwell	TN-5	18	0	-	-	0.0
TN-5	Tifblue	22	0	-	-	0.0
Tifblue	TN-5	21	10	0.0	-	0.0

a) 2013年に交配を行った。

を作出することで、両親種の優れた形質とある程度の稔性を有する個体を選抜することは可能であろう。また、5倍体雑種についても、倍数体(複五倍体)化することで稔性を回復できるかもしれない。

次に、TO-303とブルーベリー種または野生種との雑種について考察したい。TEa-1(TO-303×*V. corymbosum*)は稔性が高く、自殖交配や戻し交配で後代を容易に得ることができた。果実は比較的大きく、種子親TO-303由来の温暖地適応性をもつことも期待できる。これらのことから、TEa-1は日本型SHBを育成するための中間母本の一つとして利用できるかもしれない。

一方、同じくTO-303を種子親として作出された雑種のTO-303×*V. oldhamii*3個体については、本論文では稔性を確認することができなかった。これらの雑種個体がいずれも2倍体であるのに対し、稔性のあるTEa-1は4倍体(複二倍体)であることから、倍数性の違いが不稔の一因であることが示唆される。2倍体雑種については、複二倍体化することにより稔性を回復できるかもしれない。TO-303×*V. oldhamii*およびTO-303×*V. boninense*の交配により作出された雑種個体はいずれも果肉が薄紫～紫色で、収穫時期が極晩生であり、単為結果性を有するなど育種上重要な特性を有している。複二倍体化により稔性個体が得られれば、高アントシアニンや極晩生など新しいブルーベリー品種を開発するための育種素材として有用と考えられる。

第4章 倍数体の作出と評価

4.1 緒言

第3章では種々の雑種個体を得ることができ、それらは両親種である野生種やブルーベリーの有用形質を受け継いでいることが明らかとなった。しかし、種間雑種は概して稔性が低く、種間雑種そのものをブルーベリーの育種素材として利用することは困難がともなう。また、第3章では、日本の2倍体野生種はいずれもブルーベリーとの交雑能力が著しく低く、倍数性レベルの相違が一因であることが示唆された。これらの雑種個体や2倍体野生種を染色体倍加し、複二倍体や倍数体を作成することができれば、稔性回復や倍数体化により、ブルーベリーとの交雑が可能になると期待される。

倍数体を作成するためには、様々な植物種で効果的な手法としてコルヒチン処理が用いられる。果樹では、ブドウ(Notsuka et al., 2000)やカンキツ(Gmitter et al., 1991)、ビワ(八幡ら, 2004)のような様々な作物で倍数体を作

出するのに利用され、成功してきた。ブルーベリーおよび近縁種においては、コルヒチン処理による染色体倍加のいくつかの成功例が報告されている。Moore et al. (1964)は*V. virgatum*×*V. corymbosum*の5倍体雑種の腋芽に、津田ら(2012)は*V. corymbosum*および*V. oldhamii*などの野生種の培養シュートに処理することで、各々の染色体倍加個体を得た。しかし、腋芽を材料とすることは処理効率が低く、また、培養シュートへの処理にはまず各種・個体の培養系を確立することが必要となる。Miyashita et al. (2009)は、取り扱いの容易な種子への*in vitro*コルヒチン処理により、*V. virgatum*×*V. corymbosum*の種間交雑種子(5x)から染色体倍加個体を得られることを明らかにした。この方法を用いることで、簡便かつ効率的に複五倍体(10x)を作成することが可能となった。

本章ではまず、Miyashita et al. (2009)の手法を用いて日本の2倍体野生種および2倍体雑種から倍数体を作成した。次いで、これらの倍数体に加えて、これまでに作出されたブルーベリーの5倍体雑種の複倍数体(10x)について外部形態や稔性等を調査し、ブルーベリーの新しい育種素材としての可能性を評価した。

4.2 材料および方法

4.2.1 2倍体野生種からの倍数体作出

*V. boninense*の放任結実種子(2x)および*V. boninense*と*V. wrightii*の種間交雑種子(2x)を供試し、無菌播種した種子にコルヒチン処理を行った。無菌播種、コルヒチン処理、発芽促進の操作は、Miyashita et al. (2009)の方法に従って行った。コルヒチンの処理濃度は、*V. boninense*種子では6段階(0~4000 mg/l)、*V. boninense*×*V. wrightii*種間交雑種子では4段階(0~1000 mg/l)とし、処理期間は6日間とした。1区35粒の3反復で行い、コルヒチン処理後8週目に発芽率を調査した。また、発芽実生について、フローサイトメトリーにより倍数性レベルを評価した。実験操作は2.2.4と同様に行った。

4.2.2 倍数体の外部形態等の評価

コルヒチン処理で得られた2倍体種由来の倍数体は、順化、鉢上げの後に温室で栽培した。これらの倍数体およびMiyashita et al. (2009)が作出したブルーベリー5倍体雑種由来の複倍数体(10x)について、葉・花・果実等の特徴、開花期、収穫期を調査した。2倍体種由来の倍数体は2012年に、ブルーベリー5倍体雑種由来の複倍数体は2014年に調査した。調査方法は3.2.5と同様に行った。

4.2.3 倍数体の稔性の評価

3年生以上に生育した倍数体のうち、花数が十分に確保できた個体については、稔性および交雑能力の程度を明らかにするために自殖交配およびブルーベリーとの正逆交配を行った。交配は2013年の各種子親の開花期に実施した。交配以降の作業は3.2.2と同様に行い、「交配1花あたりの実生数」を算出して各倍数体の稔性および交雑能力を評価した。

4.3 結果

4.3.1 2倍体野生種からの倍数体作出

V. boninense 種子の発芽率は、コルヒチン処理区では無処理区の99%に比べてやや低い傾向であったものの、いずれの区もほぼ8割以上が発芽し、コルヒチン処理による発芽率の顕著な低下は認められなかった(表4-1)。この傾向は *V. boninense* × *V. wrightii* 種間交雑種子でも同様であった。

表4-1 *V. boninense* 種子および *V. boninense* × *V. wrightii* 種間交雑種子へのコルヒチン処理が発芽率および染色体倍加に及ぼす影響

種類	コルヒチン濃度 (mg/L)	発芽率 (%)	調査 個体数 ^a	倍数性レベル(個体数)			倍加個体率 ^b (%)
				2x	4x	2x+4x	
<i>V. boninense</i>	0	99	62	62			0.0
	250	98	57	57			0.0
	500	96	50	49		1	2.0
	1000	92	50	50			0.0
	2000	79	54	51	1	2	5.6
	4000	89	47	47			0.0
<i>V. boninense</i> × <i>V. wrightii</i>	0	91	29	29			0.0
	250	95	45	45			0.0
	500	95	60	59		1	1.7
	1000	90	43	38	4	1	11.6

a) フローサイトメトリーで調査した個体数。b) 倍数体(4x)と倍数性キメラ(2x+4x)の合算値。

どちらの種子においても、500 mg/L以上の濃度区で、倍数体(4x)または倍数性キメラ(2x+4x)が得られた。倍数体と倍数性キメラを合わせた倍加個体率は、*V. boninense* 種子では2000 mg/L区が5.6%と最も高かった。*V. boninense* × *V. wrightii* 種間交雑種子では、1000 mg/L区の11.6%が最高であり、*V. boninense* 種子に比べて約2倍の倍加効率であった。

4.3.2 倍数体の外部形態等の評価

コルヒチン処理で誘導された *V. boninense* および *V. boninense* × *V. wrightii* の倍数体・倍数性キメラは、多くの個体が順化、鉢上げの後、温室で順調に生育した。これらの個体について、外部形態等の特性を調査した。*V. boninense* の倍数性キメラ M-19 (2x+4x) は、対照の *V. boninense* (2x) と比べて葉身幅、葉柄長、花冠長、花冠幅が大きかった(表4-2, 図版4-1)。また、果実重は0.69gと、対照の1.3倍であった。*V. boninense* × *V. wrightii* の倍数体(4x)のMG-1, MG-2, MG-3, および倍数性キメラ(2x+4x)のMG-6, MG-7については、葉や花の形態の個体間差が大きかった。MG-1, MG-3, MG-6は、対

照の両親種(2x)および *V. boninense* × *V. wrightii* (2x) に比べて葉や花のサイズが大きい傾向であった。MG-3 および MG-7 では結実がみられ、MG-3の果実重は *V. wrightii* より重く、*V. boninense* と同程度であった。*V. boninense* × *V. wrightii* の果肉はいずれも *V. boninense* と同様に白であった。

Miyashita et al. (2009) により作出されたブルーベリー5倍体雑種由来の複倍数体(10x)6個体(*V. corymbosum* ‘Eliot’ × *V. virgatum* ‘Tifblue’ 4個体, *V. corymbosum* ‘Spartan’ × *V. virgatum* ‘Homebell’ 2個体)について、外部形態等の特性を調査した。複倍数体の果実はいずれも果粉が少なく黒色を呈し、収穫時期はほとんどが両親品種の中間的か晩生の傾向であった(表4-3, 図版4-2)。これらの特徴は、5倍体雑種と同様であった(表3-11)。一方、果実重については、5倍体雑種が概ね両親品種より軽い傾向であったのに対して、複倍数体のHRP-13およびHRP-28は各々1.72g, 1.39gで両親品種(1.24g)よりも重く、HRP-25は2.13gで種子親‘Spartan’(2.22g)と同程度であった。

表4-2 *V. boninense* および種間雑種 *V. boninense* × *V. wrightii* の倍数体の形態等の評価^a

種類・個体名		倍数性 レベル	葉身長 (mm)	葉身幅 (mm)	葉柄長 (mm)	花冠長 (mm)	花冠幅 (mm)		
倍数体・倍数性キメラ									
<i>V. boninense</i>	M-19	2x+4x	37.6	26.2	3.6	12.4	9.4		
	MG-1	4x	47.6	28.2	3.9	11.1	9.6		
	MG-2	4x	33.8	17.8	3.0	8.6	7.0		
<i>V. boninense</i> × <i>V. wrightii</i>	MG-3	4x	33.6	21.4	2.1	9.8	10.1		
	MG-6	2x+4x	50.2	23.0	3.2	9.6	9.3		
	MG-7	2x+4x	32.4	20.6	2.7	8.1	8.0		
対照									
<i>V. boninense</i>		2x	37.2	19.0	3.0	9.5	5.9		
<i>V. wrightii</i>		2x	41.2	19.2	2.4	7.1	6.8		
<i>V. boninense</i> × <i>V. wrightii</i>	MG-10	2x	43.2	26.8	3.1	8.1	7.3		
種類・個体名		花の香り	開花期	果実重(g)	果実縦径 (mm)	果実横径 (mm)	果粉	果肉色	収穫時期
倍数体・倍数性キメラ									
	M-19	やや有り	12~4月	0.69	9.9	10.5	極弱	白	11月 ^c
	MG-1	無し	12~1月	- ^b					
	MG-2	無し	1~2月	- ^b					
	MG-3	やや有り	2~5月	0.58	9.5	10.1	極弱	白	10月 ^c
	MG-6	やや有り	1~2月	- ^b					
	MG-7	やや有り	12~5月	0.12	6.1	6.0	極弱	白	11月 ^c
対照									
<i>V. boninense</i>		有り	1~5月	0.52	9.3	9.8	極弱	白	12~1月
<i>V. wrightii</i>		無し	2~4月	0.26	7.8	7.6	極弱	薄紫	11~12月
MG-10		無し	1~5月	0.52	8.8	9.8	極弱	白	11月 ^c

a) 2012年, 4年生苗を調査した。b) 結実しなかったため, 果実データ無し。c) 結実量が少ないため参考値。

表4-3 種間雑種 *V. corymbosum* × *V. virgatum* の複倍数体の形態等の評価^a

交配組合せ・個体名	倍数性 レベル	葉身長 (mm)	葉身幅 (mm)	葉柄長 (mm)	花冠長 (mm)	花冠幅 (mm)	花柄長 (mm)	花色
Eliot × Tifblue								
♀ Eliot	4x	65.0	35.6	3.9	9.3	7.0	5.7	白～淡桃
HRP-12		53.8	26.6	3.2	10.7	5.5	5.4	白～淡桃
F ₁ HRP-13	10x	51.8	27.0	3.3	13.0	6.8	8.7	白
HRP-14		51.0	26.6	2.7	10.8	7.1	6.4	白～淡桃
HRP-28		57.8	30.0	2.8	9.6	7.0	8.0	白～淡桃
♂ Tifblue	6x	53.6	24.0	2.7	10.6	5.7	8.4	白～淡桃
Spartan × Homebell								
♀ Spartan	4x	72.4	36.8	4.4	9.2	10.1	6.3	白
HRP-24		62.2	34.0	3.7	8.0	7.8	7.5	白～淡桃
F ₁ HRP-25	10x	60.6	38.8	3.5	11.1	9.0	8.5	白～淡桃
♂ Homebell	6x	56.4	28.0	2.4	10.0	6.9	6.6	白
交配組合せ・個体名	開花期	がくあ の深さ	果実重(g)	果実縦 径(mm)	果実横 径(mm)	果粉	果肉色	収穫時期
Eliot × Tifblue								
♀ Eliot	4～5月	深	1.24	10.2	14.2	強	白	7月
HRP-12	4～5月	浅	0.75	9.1	11.6	中	白	7月
F ₁ HRP-13	4月	浅	1.72	11.6	15.6	弱	白	7～8月
HRP-14	4～5月	中	0.63	8.6	11.2	弱	白	8月
HRP-28	4～5月	中	1.39	11.0	14.4	弱	白	8月
♂ Tifblue	4～5月	浅	1.24	10.2	14.2	強	白	7～8月
Spartan × Homebell								
♀ Spartan	4月	中	2.22	12.4	17.5	強	白	6月
HRP-24	4月	中	1.35	11.5	13.8	弱	白	6～7月
F ₁ HRP-25	4月	中	2.13	13.0	16.6	中	白	8月
♂ Homebell	4～5月	浅	1.28	11.3	13.8	中	白～淡紫	7～8月

a) 2014年, 11年生苗を調査した。

4.3.3 倍数体の稔性の評価

倍数体の稔性および交雑能力を評価するために交配試験を行った。*V. boninense* および *V. boninense* × *V. wrightii* の倍数体 (4x) ・ 倍数性キメラ (2x+4x) 計 6 個体について自殖交配を行ったところ、M-19 と MG-7 の 2 個体が結実し、実生が得られた (表 4-4)。交配 1 花あたりの実生数および稔性程度は、M-19 が 0.60 個で「中」、MG-7 が 0.06 個で「低」であった。また、4 倍体の *V. corymbosum* との正逆交配では、いずれの倍数体・倍数性キメラにおいても交雑実生は得られなかった。

ブルーベリー 5 倍体雑種由来の複倍数体 (10x) では、6 個体を用いて交配試験を行った。自殖交配では 3 個体で結実し、1 個体で種子が得られたが、実生は得られな

かった (表 4-5)。一方、ブルーベリー 2 種との正逆戻し交配では、5 倍体雑種の場合はほとんどの個体で交雑できなかったのに対し (表 3-15)、複倍数体では HRP-12 など 4 個体で交雑実生を得ることができた。交雑実生が得られたのは、24 組合せ中の 4 組合せ (*V. corymbosum* × HRP-28, HRP-12 × *V. virgatum*, *V. virgatum* × HRP-14, HRP-24 × *V. virgatum*) であり、交配 1 花あたりの実生数は 0.05~0.17 個で、交雑能力はいずれも「低」であった。このように、5 倍体雑種由来の複倍数体の半数以上はブルーベリー種との戻し交配において交雑能力を有することが明らかとなった。なお、HRP-14 は、種子親に用いた場合の交配において結実率が 33~45% と高く、単為結果性を有することが示唆された。

表4-4 *V. boninense* および種間雑種 *V. boninense* × *V. wrightii* の倍数体の稔性評価^a

交配組合せ		交配 花数	結実率 (%)	種子数 /果	発芽率 (%)	実生数 /花
♀	♂					
自殖交配						
M-19 (2x+4x)		5	60	1.0	100	0.60
MG-1 (4x)		13	0			0
MG-2 (4x)		13	0			0
MG-3 (4x)		11	0			0
MG-6 (2x+4x)		11	0			0
MG-7 (2x+4x)		17	6	1.0	100	0.06
<i>V. corymbosum</i> との正逆交配 ^b						
M-19	Berkeley	14	0			0
Berkeley	M-19	21	0			0
M-19	spartan	13	0			0
spartan	M-19	20	100	0.0		0
MG-1	Berkeley	- ^c				-
Berkeley	MG-1	17	0			0
MG-1	spartan	6	0			0
spartan	MG-1	17	71	0.0		0
MG-2	Berkeley	16	0			0
Berkeley	MG-2	20	80	0.0		0
MG-2	spartan	21	0			0
spartan	MG-2	17	71	0.0		0
MG-3	Berkeley	14	0			0
Berkeley	MG-3	17	29	0.0		0
MG-3	spartan	26	0			0
spartan	MG-3	17	29	0.0		0
MG-7	Berkeley	21	0			0
Berkeley	MG-7	19	26	0.0		0
MG-7	spartan	21	0			0
spartan	MG-7	22	36	0.0		0

a) 2013年に交配を行った。b) MG-6は開花数が少なかったため未実施。c) 欠測。

表4-5 種間雑種 *V. corymbosum* × *V. virgatum* の複倍数体 (10x) の稔性評価^a

交配組合せ		交配花数	結実率(%)	種子数 /果	発芽率(%)	実生数 /花
♀	♂					
自殖交配						
HRP-12		22	0			0
HRP-13		18	6	3.0	0	0
HRP-14		21	33	0.0		0
HRP-28		18	39	0.0		0
HRP-24		21	0			0
HRP-25		15	0			0
<i>V. corymbosum</i> (Berkeley)との正逆交配						
HRP-12	Berkeley	17	18	1.0	0	0
Berkeley	HRP-12	20	10	0.0		0
HRP-13	Berkeley	17	0			0
Berkeley	HRP-13	15	40	0.0		0
HRP-14	Berkeley	20	40	0.0		0
Berkeley	HRP-14	18	0			0
HRP-28	Berkeley	18	28	0.2	0	0
Berkeley	HRP-28	17	6	1.0	100	0.06
HRP-24	Berkeley	25	0			0
Berkeley	HRP-24	16	25	0.0		0
HRP-25	Berkeley	17	12	0.0		0
Berkeley	HRP-25	21	0			0
<i>V. virgatum</i> (Brightwell)との正逆交配						
HRP-12	Brightwell	18	28	1.0	60	0.17
Brightwell	HRP-12	19	58	0.0		0
HRP-13	Brightwell	17	0			0
Brightwell	HRP-13	15	53	0.0		0
HRP-14	Brightwell	20	45	0.0		0
Brightwell	HRP-14	15	33	1.4	14	0.07
HRP-28	Brightwell	18	0			0
Brightwell	HRP-28	15	0			0
HRP-24	Brightwell	21	24	3.2	6	0.05
Brightwell	HRP-24	15	0			0
HRP-25	Brightwell	19	21	0.0		0
Brightwell	HRP-25	20	0			0

a) 2013年に交配を行った。

4.4 考察

(1) *in vitro* コルヒチン処理法の有効性

本論文では、*in vitro* コルヒチン処理法の有効性について検討し、Miyashita et al. (2009) が開発したブルーベリー種子への *in vitro* コルヒチン処理法は、*V. boninense* および *V. boninense* と *V. wrightii* の種間雑種においても倍数体を作出できることが明らかとなった。本手法は、材料として生産、取り扱いの容易な種子を用いており、*Vaccinium* 属の複数の種で 5.6~50.0% と高効率で倍数体の作出に成功している。このことから、*Vaccinium* 属の他の種においても汎用的に使える手法であると考えられる。

本論文で用いた *V. boninense* 種子と *V. boninense* × *V. wrightii* 種子では、後者の倍加個体率が約 2 倍高かった。両親種より種間雑種の方が倍加しやすいという現象は *V. corymbosum* × *V. virgatum* と両親種 (Miyashita et al., 2009) および *V. darrowi* × *V. elliottii* と両親種 (Perry and Lyrene., 1984) の間でも報告されている。*Vaccinium* 属の種間雑種ゲノムはなんらかの不安定性を持っており、それが複倍数体化によって安定化することが示唆される。

in vitro コルヒチン処理法では、倍数体に加えて倍数性キメラも誘導された。ブルーベリー 5 倍体雑種由来の倍数性キメラ (5x+10x) では、その多くが深刻な生育低下もなく正常な生育を示し (Miyashita et al., 2009)、細胞層構成が 5x-5x-10x または 5x-10x-10x の周縁キメラ (宮下ら, 2006) であることが報告されている。また、安田ら (2008) は、ニンポウキンカン (*Fortunella crassifolia*) の倍数性周縁キメラ (2x+4x) が、4 倍体より果実が大きく、2 倍体より種子が少なく厚皮であるなどの価値ある特性を持つことを報告している。本手法で誘導される種々の倍数性キメラについても、稔性や果実品質を含めた諸特性を調査し、ブルーベリーの育種や栽培における利用可能性を評価することが重要と考えられる。

(2) 2 倍体野生種由来の倍数体の評価

次に、本論文で作出された *V. boninense* および *V. boninense* × *V. wrightii* の倍数体 (4x) ・倍数性キメラ (2x+4x) についてみると、いずれもブルーベリーとの交雑能力は確認できなかったものの、一部の個体が自殖稔性を有することが明らかとなった。種間交配における交雑能力には、倍数性レベルに加えて個体間差も影響すると考えられるため、今後はより多くの倍数体を作出し、ブルーベリーとの交雑能力の有無を評価する必要がある。

V. boninense を含め、第 3 章の交配試験に用いた野生種はいずれも自家不和合性の傾向であったことから (表 3-2)、*V. boninense* の倍数性キメラ (2x+4x) が自殖稔性を有し、その稔性程度が「中」と比較的高かったことは

特筆すべき結果である。ブルーベリー種においても、*V. virgatum* は自家不和合性が強く、経済栽培では他家受粉が必要であり、また、*V. corymbosum* は他家受粉でも比較的良く結実するが、結実率や果実の大きさを高めるためには他家受粉が望ましいとされる (玉田, 2008)。この倍数体のように自家和合性を有する個体をブルーベリー育種に利用することで、単一品種での栽培が可能な自家和合性のブルーベリー品種を育成することが可能となるかもしれない。

また、作出された倍数体・倍数性キメラの一部個体は、果実サイズが両親種より大きく、染色体倍加による大型化の効果が認められた。野生種をブルーベリーの育種に利用するにあたっては、果実が小さいという野生種の欠点が増倍数体化によって改善されることは有用と考えられる。

(3) ブルーベリー 5 倍体雑種由来の複倍数体の評価

さらに、ブルーベリー 5 倍体雑種由来の複倍数体 (10x) についてみると、交配試験の結果から複倍数体は両親種との戻し交雑が可能であることが明らかとなった。複倍数体は、5 倍体に比べて稔性のある個体の割合が高く、複五倍体化により稔性回復したことが示唆される。第 3 章で、5 倍体雑種は総じて収穫期が晩生傾向で、果実が黒色を呈するなどユニークな形質を持つことがわかったが、複倍数体 (10x) もまたこれらの特徴を共通して持つことが判明した。加えて、複倍数体では両親より果実の大きい個体も見出されており、育種素材としての利用価値はあると考えられた。

なお、複倍数体 (10x) と両親種 (4x および 6x) との交配で得られた交雑実生は、7 倍体や 8 倍体などブルーベリーとしてはユニークな倍数性の個体集団となっている可能性がある。今後、後代の倍数性レベルや稔性、果実形質等の特性を調査し、複倍数体の育種素材としての利用価値を詳細に評価することが必要である。

第 5 章 総合考察

ハイブッシュブルーベリー (*V. corymbosum*; 本章では HB と略す) は寒冷地の気候に適合し、温暖地での経済栽培は困難である。そこで米国では、南部に自生する野生種 *V. darrowi* との種間雑種を作出し、これを端緒として温暖地に向くサザンハイブッシュブルーベリー (本章では SHB と略す) の開発に成功した (Lyrene 1997; Ballington, 2009)。一方、日本には亜熱帯地域に自生する *V. boninense* などブルーベリーに近縁の *Vaccinium* 属野生種が多数あるにも関わらず、これら育種素材が活用でき

ていない。日本の環境条件に適合し、良食味で多収性のブルーベリー品種を開発するためには、日本在来野生種とブルーベリーの交雑能力を評価し、それら種間雑種の育種的利用を図ることが必要である。そこで、本論文では、日本在来野生種の育種的利用を目指した *Vaccinium* 属の遺伝的類縁関係、倍数性レベルおよび種間雑種に関する基礎的研究を行った。

その結果、第2章では、HBで開発されたSSRマーカーが、日本の野生種を含めた広範な *Vaccinium* 属種の多型解析に有効であり(表2-4)、遺伝的類縁関係の推定(図2-2)に加えて、倍数性レベルの評価(表2-5)にも有用であることを示した。第3章では、*Vaccinium* 属種間の交配における交雑能力を評価するために、総当たりの正逆交配を行った。その結果、節や倍数性レベルの異なる種間の交雑能力は著しく低く、倍数体種のブルーベリーと日本の2倍体野生種の交雑は困難であることを明らかにした(表3-10)。一方で、TO-303のように、節や倍数性レベルを超えて広範な交雑能力を有する特筆すべき素材があることを発見した。また、作出された雑種はいずれも種々の有用な特性を有する(表3-11~14)ものの、概して稔性が低く(表3-15, 表3-17)、育種素材として用いるためには稔性回復が課題となることがわかった。第4章では、倍数性レベルの相違による交雑不親和や、雑種の低稔性の問題を解決するため、*Vaccinium* 属植物の倍数体を効率的に作出する手法の確立を試みた。その結果、ブルーベリーで開発された *in vitro* コルヒチン処理法(Miyashita et al., 2009)、日本在来野生種やその種間雑種の倍数体作出にも有効であることを明らかにした(表4-1)。また、作出された倍数体の中には正常な稔性を有する個体があることを確認し(表4-4~5)、倍数体が育種素材として利用できることを明らかにした。

そこで、上述した本論文の結果をふまえて、(1)日本の2倍体野生種とHBとの種間交雑を成功させるための方法論、(2)種間交雑種子の発芽率の向上、(3)ブルーベリー5倍体雑種の利用、(4)ブルーベリー育種におけるSSRマーカーの有用性について言及したい。

(1) 日本の2倍体野生種とHBとの雑種作出の方法論

まず、種間交雑の成否に影響する要因としては、第2章の遺伝的類縁関係の推定や第3章の正逆交配の結果、過去の雑種作出の事例から、類縁関係の遠近よりも倍数性レベルの相違のほうが大きいことが示唆された。したがって、日本の2倍体野生種とHBの交雑を成功させる一つ目の方法としては、野生種の倍数体を作成して交雑に用いることが有効と考えられる。すなわち、2倍体野生種とHBは直接交雑できないが、野生種の倍数体を作成し、この4倍体とHBを交雑することで、*V. bracteatum*の倍数体(Tsuda et al., 2013)と同様に、種間雑種の作出が可能になると考えられる(図5-1(1))。第4章の *in vitro* コルヒチン処理法を用いれば、2倍体野生種の倍数体を効率的に作出することができる。この手法により大規模な倍数体集団を作成すれば、HBと交雑能力を有する個体が得られると期待される。

一方、第3章では、種間雑種TO-303が、節や倍数性レベルを超えて広範な交雑能力を有することが明らかとなった(表3-10)。TO-303は、4倍体のHBと日本の2倍体野生種の双方と交雑が可能であった。このことから、日本の2倍体野生種とHBとの交雑を成功させる二つ目の方法として、TO-303を橋渡し植物に用いることが考えられる。すなわち、まずTO-303と野生種との雑種を作成し、次いでこの雑種とHBとを交雑するという方法である(図5-1(2))。ただし、第3章で作出したTO-303と日本の野生種との雑種個体(2x)については、いずれも稔性を確認することができなかった(表3-17)。しかし、より多くの雑種個体を作成することで、TO-303のように非還元配偶子を産生し、HBと交雑可能な個体が得られるかもしれない。

また、三つ目の方法として、TO-303と野生種の雑種(2x)の複二倍体を作成し、HBとの交雑に用いることも提案したい(図5-1(3))。第3章では、ブルーベリーの5倍体雑種の複倍数体が、もとの5倍体に比べて稔性回復していることが示唆された(表4-5)。TO-303と日本在来野生種の雑種についても、複二倍体化により稔性を回復できるかもしれない。

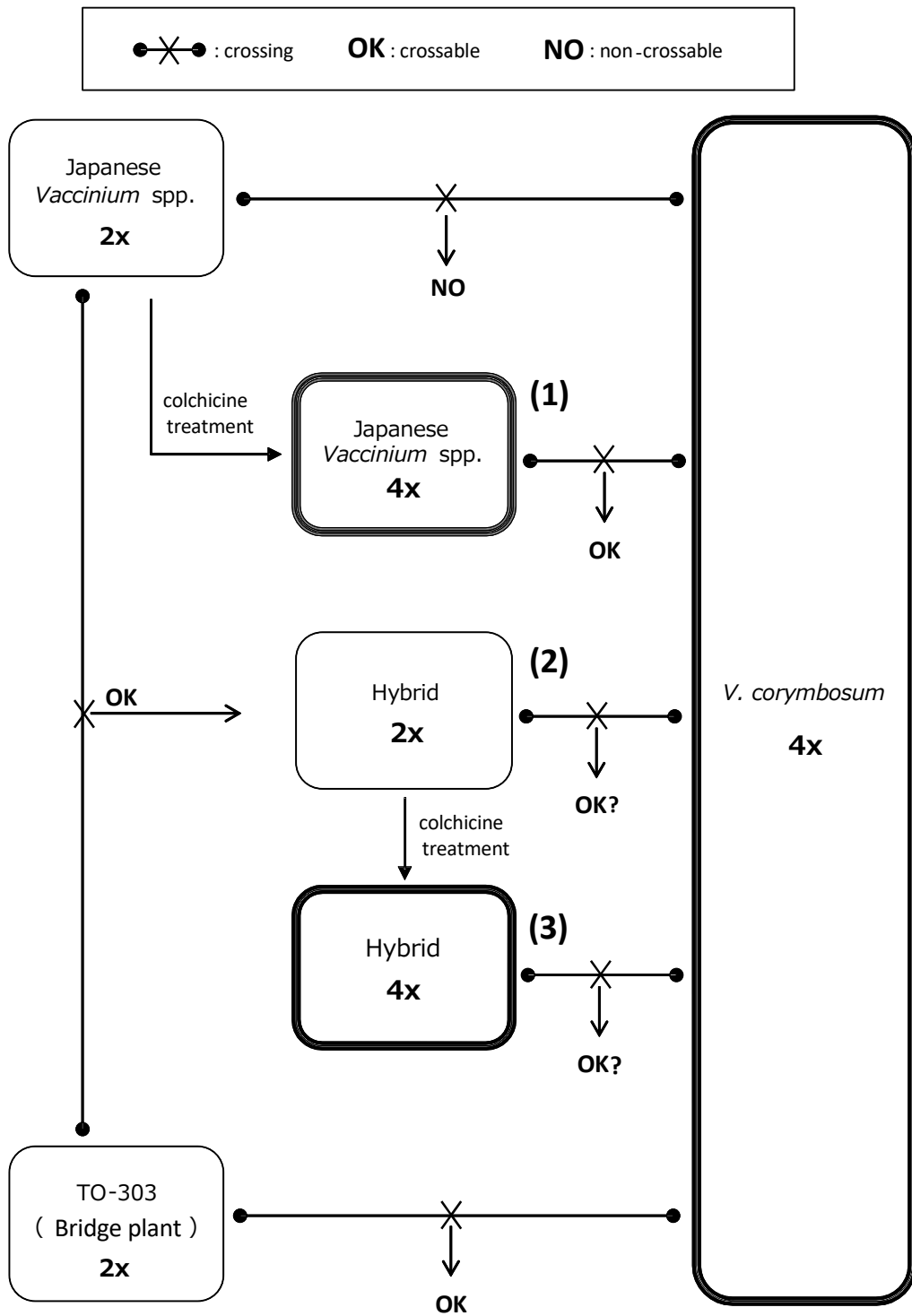


図 5-1 日本在来野生種 (2x) とハイブッシュブルーベリー (*V. corymbosum*, 4x) の種間雑種を作出するための方法論

- (1) コルヒチン処理により野生種の倍数体を作成する
- (2) 野生種と TO-303 の雑種を作成する
- (3) コルヒチン処理により (2) の雑種の複二倍体を作成する

なお、種間雑種 TO-303 については、なぜこのように広い交雑能力を有するのかという疑問が残る。ブルーベリーなど *Cyanococcus* 節種は中南米を起源地とし、北アメリカに伝播したと考えられている (Luby et al., 1991)。そこで、*Vaccinium* 属全体の起源地も同様に中南米であると仮定してみる。そして、*V. darrowi* および *V. elliotii* は、起源地に近い米国南部に自生する 2 倍体野生種であることから、*Vaccinium* 属の共通の祖先種に比較的近い種であると考えられる。このように仮定すれば、*V. darrowi* と *V. elliotii* の種間雑種である TO-303 が節の異なる多くの種との交雑能力を有することの説明がつく。これらの推論について本論文で論証することはできないが、今後より精度の高い系統解析が行われ、*Vaccinium* 属種の関係性について解明が進むことが望まれる。

(2) 種間交雑種子の発芽率の向上

本論文では、ブルーベリーと野生種等との間で種々の交配を行ったが、雑種の獲得率は極めて低かった。また、第3章および第4章で行った種々の交配では、交雑種子は得られるものの、まったく発芽しない組合せがあった (表 3-6, 表 3-15, 表 3-17, 表 4-5)。したがって、各交配組合せにおいて交雑能力をより正確に評価し、交雑実生の獲得率を高めるためには、発芽率の向上についても検討する必要がある。不発芽の一因としてはまず、雑種致死の影響が推測される。Miyashita et al. (2009) が開発した *in vitro* での種子培養は、発芽能力の低いブルーベリー種間交雑種子に対して健全な発芽と生育を促進するのに有効である。本論文でも交雑種子は全て *in vitro* で播種しているが、まったく発芽しなかった組合せについては、幼胚の救済、すなわち胚培養など別の手法を検討する必要があるだろう。

また、不発芽の要因として種子の休眠性の影響も考えられる。第3章の HB とラビットアイブルーベリー (*V. virgatum*; 本章では RB と略す) の種間交配では、交配 1 花あたりの実生数は HB を種子親にしたほうが多かったが、交雑種子の発芽率は逆交配のほうが有意に高かった (表 3-5)。HB 種子の休眠性は RB より深く (Darrow and Scott, 1954)、HB 種子の休眠打破には恒温条件よりも 10~32°C の変温条件のほうが効果的である (Stushnoff and Hough, 1968)。このことから、HB 上で生産された種間交雑種子は、種子親から生じた休眠誘導物質を蓄積していると推測される。他の不発芽の交配組合せについても、種子親の休眠性が関わっている可能性がある。山崎ら (2015) は、ブルーベリー種子の発芽促進に赤色光が有効であったと報告している。不発芽の種子については、十分な休眠打破を行うための温度、薬剤、光条件などを

検討する必要があるだろう。

(3) ブルーベリー5倍体雑種の利用

次に、HB と RB の 5 倍体雑種の利用についても言及したい。これまでに論じてきた、日本在来野生種を用いたブルーベリー育種は、米国における SHB 開発の日本版を実現する上で重要なプログラムとなるはずである。しかし、野生種を用いた育種は、ブルーベリーとの交雑が著しく困難であることや、交雑の過程で野生種のもつ種々の劣悪な形質 (果実が小さい、食味が劣る、など) を除去しながら有用形質のみを残すことの難しさを勘案すると、難易度の高い育種と言わざるを得ない。一方、ブルーベリーの 5 倍体雑種については、両親種の交雑親和性が比較的高いことから大規模な雑種集団を作出することは容易であり (表 3-5)、栽培種間の雑種であるため劣悪な形質が導入される心配も無い。5 倍体雑種では、収穫時期の晩生化、果実の黒色化などの共通する特性があり、果実サイズなどは個体間差が大きく多様であった (表 3-11)。また、5 倍体雑種からは、RB と同程度の高 pH 土壌適応性を有する個体を選抜できることが報告されている (宮下・石川, 2008)。5 倍体雑種や、その複倍数体 (10x) の大規模集団の中から、HB のもつ優れた果実品質と RB のもつ温暖地適応性や土壌適応性、晩生性を兼ね備え、ある程度の稔性を有する雑種個体を選抜できる可能性はある。それらの雑種は、日本型の SHB 開発のための育種素材として利用できると考えられる。

また、5 倍体雑種とその複倍数体では、単為結果性を示す個体が見出された (表 3-15, 表 4-5)。ブルーベリーではジベレリン (GA_3) 処理により単為結果の誘起が可能であり (Mainland and Eck, 1968)、米国ではジベレリン散布による結実確保の技術が確立されている (玉田, 2008)。また、HB (Ehlenfeldt and Vorsa, 2007) および RB (Ehlenfeldt and Hall, 1996) では単為結果性を示す系統の評価が行われているが、薬剤処理が不要の単為結果性品種はまだ実用化されていない。単為結果性の品種を用いれば授粉樹が不要となるため、単一品種での栽培が可能となる。また、近年ではブルーベリーを植物工場で生産する手法が開発されている (Aung et al., 2014)。自動的単為結果性の品種であれば訪花昆虫が不要となるため、植物工場のような閉鎖空間での栽培にも適すると考えられる。また、単為結果した果実は無種子であることから、果実の食味性やジャム等の加工適性も向上する。単為結果性を示す雑種個体を育種素材に用いて、その特性を生かした品種が開発できれば、ブルーベリーの生産・利用の拡大に寄与できるだろう。

(4) SSR マーカーの有用性

本論文では、種間雑種に関して種々の新しい知見を得たことに加えて、SSR マーカーの汎用的な有用性を確認することができた。すなわち、HB で開発された SSR マーカーは、ブルーベリー種を含めた *Cyanococcus* 節の種・個体の遺伝的類縁関係の評価に利用できることがこれまでに報告されているが (Bian et al., 2014)、本論文ではさらに、日本在来野生種を含めた *Vaccinium* 属の広範な節・種の遺伝的類縁関係や倍数性レベルの評価にも利用できることを示し、種間交雑育種の基礎資料となる樹形図や倍数性レベルのデータを作成することができた。加えて、これらの SSR マーカーを用いることで、*Vaccinium* 属の種間交雑実生の雑種性や倍数性レベル、ゲノム構成を評価できることも示した。

SSR 多型解析は、発芽したばかりの若い実生苗でも分析することができ、迅速かつ正確に多くの情報を得ることができる。ブルーベリーの SSR マーカーは、これまで主として遺伝的多様性の解析 (Brevis et al., 2008; Bian et al., 2014) や品種識別 (櫛川ら, 2006; Hinrichsen et al., 2009) に利用されてきたが、今後は *Vaccinium* 属の種間交雑育種を効率的に進めるためのツールとしても活用できると考えられる。

一方、SSR マーカーについては、ほとんどの種ではシングルローカスであったマーカーが *V. myrtillus* でのみマルチローカスであると示唆され、樹形図における *Myrtillus* 節の分布が既報 (Powell and Kron, 2002; Tsutsumi, 2011) と一部異なるなど、検討を要する結果がみられた。本論文では、一つの種で開発されたマーカーを近縁の多様な種の解析に用いたため、ターゲットとする遺伝子座に生じた大きな変異が解析に影響した可能性がある。また、本論文で用いた EST-SSR マーカーは花芽の低温順化に関わる EST ライブラリーに由来するため (Boches et al., 2005)、その解析結果は特定の形質に偏った評価となっているかもしれない。これらの点については、近年、次世代シーケンサーの汎用化などによりマーカー開発のコストと労力が大幅に改善されていることから、今後は使用するマーカー数を増やすことで解析の精度を上げることができるだろう。

本論文では、第 2 章と第 3 章の結果および過去の雑種作出の事例をもとに、種間交雑の成否に影響する要因としては遺伝的類縁関係の遠近よりも倍数性レベルの相違のほうが大きいと推測した。しかしながら、育種素材の遺伝的類縁関係を明らかにすることは、ブルーベリーの効率的な育種プログラムを構築するために必要である。たとえ倍数性の障壁を克服して目的とする雑種が得られたとしても、その雑種が十分な稔性を有し、実用品種を

生み出す育種素材として利用できるかどうかには、類縁関係の程度が影響するかもしれないからである。現状では、SHB など種間交雑育種に由来するブルーベリー品種はいずれも、育種素材として *Cyanococcus* 節内の種のみが用いられている (Ballington, 2009)。しかし、近年では *Cyanococcus* 節外の多くの種がブルーベリーの有望な育種素材と目され、これまでに多数の節間雑種が作出されていることから (Luby et al., 1991; Ballington, 2009)、近い将来には節間雑種に由来するブルーベリー品種が開発されることだろう。これら節間雑種の育種素材としての評価に加えて、SSR マーカー等による遺伝的類縁関係の解析を平行して進めることで、ブルーベリーの交雑育種の成否に関わる有用な知見が得られ、節間雑種を用いた効果的な育種プログラムの構築が可能になると考えられる。

摘 要

ブルーベリーの主要な栽培種の一つである 4 倍体種 (4x) の *Vaccinium corymbosum* (ハイブッシュブルーベリー; 以下、HB と表記する) は、寒冷地の気候に適合し、温暖地での経済栽培は困難である。そこで米国では、南部に自生する野生種 *V. darrowi* (2x) との種間雑種を作出し、これを端緒として温暖地に向く HB の開発に成功した。一方、日本には亜熱帯地域に自生する *V. boninense* (ムニンシャシャンボ) など多様な *Vaccinium* 属野生種が 19 種存在し、日本の環境条件に適合する新しいブルーベリー品種を開発するための育種素材として有望である。しかし、野生種に関しては遺伝的類縁関係や交雑親和性などの知見が少ないため、育種素材として活用できない。そこで本論文では、日本在来野生種の育種利用を目指して、*Vaccinium* 属種の遺伝的類縁関係、倍数性レベルおよび種間雑種に関して基礎的研究を行い、以下の知見を得た。

1. 日本在来野生種 15 種を含めた *Vaccinium* 属 22 種について、HB で開発された SSR マーカー 12 種類を用いて多型解析を行った。その結果、全組合せ (264) のうち 94% で推定アリルを検出でき、多型データに基づいて作成した樹形図では各種の分布が従来の形態学的分類と概ね一致した。また、多型解析で検出された最大アリル数をもとに各種の倍数性レベルを推定したところ、21 種でフローサイトメトリーまたは既報のデータと一致した。これらのことから、HB の SSR マーカーが広範な *Vaccinium* 属種の多型解析に有効であり、類縁関係や倍数性レベルの評価に有用であることがわかった。
2. ブルーベリーと日本在来野生種を含めた *Vaccinium* 属

8種類の交雑能力を評価するため、総当たりの正逆交配を行った。ブルーベリーではHBと*V. virgatum* (ラビットアイブルーベリー, 6x)の2種間で交配を行い、正逆どちらの交配でも種間雑種が得られた。ブルーベリー2種と野生種等6種類(2x)の間では24組合せの交配を行い、1組合せ(TO-303×HB)でのみ雑種が得られた。TO-303(2x)は米国野生種間の雑種(*V. darrowi* × *V. elliotii*)であり、TO-303×HBの交配は倍数性レベルの異なる組合せであった。野生種等6種類間では30組合せの交配を行い、8組合せで雑種が得られた。このうちの3組合せは、TO-303を種子親とし、TO-303の両親種とは節の異なる日本の野生種3種を花粉親とする雑種であった。これらの結果から、ブルーベリー2種のように同じ節で倍数性レベルが近い種間では比較的雑種を得やすいこと、ブルーベリーと日本の2倍体野生種のように節や倍数性レベルが異なる種間では雑種作出が著しく困難であることが明らかとなった。また、種間交雑の成否には、類縁関係の遠近よりも倍数性レベルの相違が大きく影響することが示唆された。一方、TO-303のように、節や倍数性レベルを超えて広範な交雑能力を有する素材があることを発見した。また、作出された雑種はいずれも種々の有用な特性を有するものの、概して稔性が低く、育種素材として用いるためには稔性回復が課題となることがわかった。

3. 倍数性レベルの相違による交雑不稔や雑種の低稔性の問題を解決するため、*Vaccinium* 属植物の倍数体を効率的に作出する手法の確立を目指した。ブルーベリーで開発された*in vitro* コルヒチン処理法を*V. boninense* およびその種間雑種に用いた結果、どちらにおいても倍数体または倍数性キメラを作出することができた。本論文および既報において、本手法は*Vaccinium* 属の複数の種の倍数体を高効率(5.6~50.0%)で作出できたことから、汎用的に使える手法であると考えられた。また、作出された倍数体については、正常な稔性をもつ個体があったことから、育種素材として利用できると考えられた。

以上の結果をもとに、日本の2倍体野生種とHBとの種間交雑を成功させるための3つの方法論を提案した。一つ目は、野生種の倍数体(4x)を作出してHBとの交雑に用いる方法である。*in vitro* コルヒチン処理法によって大規模な倍数体集団を作出すれば、ブルーベリーとの交雑能力を有する倍数体得られると考えられる。二つ目は、TO-303を橋渡し植物に用いる、すなわち、まずTO-303と野生種との雑種を作出し、次いでこの雑種とHBとを交雑する方法である。本論文で作出したTO-303と野生種の雑種(2x)はいずれも不稔であったが、より

多くの雑種個体を作成することで交雑能力を持つ個体得られる可能性がある。三つ目は、この雑種個体が不稔であった場合に、コルヒチン処理で複二倍体化し、稔性回復させる方法である。

謝 辞

本研究の実施にあたり、主指導教員の東京農工大学教授 荻原 勲博士には、研究計画からデータの解釈と取りまとめ、論文作成まで多大なるご指導を賜り、厚く御礼申し上げます。副指導教員の茨城大学准教授 井上栄一博士にはSSR解析や論文校閲で懇切丁寧なご指導を賜り、副指導教員の東京農工大学准教授 山田哲也博士にはDNA実験で多大なるご支援と貴重なご教示を賜りましたこと、謹んで御礼申し上げます。現 日本ブルーベリー協会会長 石川駿二氏には交配試験の実施にあたって全面的なご支援を賜り、群馬県農業技術センター 櫛川 聡博士にはSSRプライマーの利用に際して終始ご支援をいただき、千葉大学教授 三位正洋博士には論文作成にあたり貴重なご意見とご助言を賜りました。各位に厚く御礼申し上げます。

また、SSR解析の実施にあたり昼夜を問わずご協力いただいた茨城大学大学院のMatra Deden Derajat様、論文作成ではいつも相談にのっていただき、有益なご助言をくださった元 東京農工大学大学院のAung Thanda博士、実験や材料維持でご尽力いただいた現 東京都南多摩農業改良普及センターの鶴沢玲子様、実験の実施にあたりいつもご協力をいただいた、東京農工大学農学部園芸学研究室ならびに植物育種学研究室の皆様、茨城大学農学部園芸学研究室の皆様に、心から深く感謝の意を表します。

さらに、東京都農林総合研究センター園芸技術科植物バイオテク研究チームの皆様には、研究活動のあらゆる面でご協力をいただき、同センターの職員の皆様には、社会人学生として業務と学業の両立をする上で多大なるご支援をいただきました。あらためまして各位に厚く御礼申し上げます。

最後に、常日頃より学位取得を強く勧めてくださった東京農工大学教授 故平田 豊博士、大学院入学を精神的に後押ししてくださった東京都農林総合研究センター竹内 純博士に謹んで感謝の意を表します。御二人の厳しくも優しい叱咤激励が無ければ、無精者の私が学位取得を目指すことはありませんでした。そして、日々の生活の中で研究活動をいつも応援し、支えてくれた家族や友人達に感謝いたします。

引用文献

- Aung, T., Y. Muramatsu, N. Horiuchi, J. Che, Y. Mochizuki and I. Ogiwara (2014) Plant growth and fruit quality of blueberry in a controlled room under artificial light. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 83: 273-281.
- Ballington, J.R. (2009) The role of interspecific hybridization in blueberry improvement. In IX International *Vaccinium* Symposium 810: 49-60.
- Bell, D.J., L.J. Rowland, J.J. Polashock and F.A. Drummond (2008) Suitability of EST-PCR markers developed in highbush blueberry for genetic fingerprinting and relationship studies in lowbush blueberry and related species. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 133: 701-707.
- Besnard G., C. Garcia-Verdugo, R.R. De Casas, U.A. Treier, N. Galland and P. Vargas (2008) Polyploidy in the olive complex (*Olea europaea*): evidence from flow cytometry and nuclear microsatellite analyses. *Annals of Botany* 101: 25-30.
- Bian, Y., J. Ballington, A. Raja, C. Brouwer, R. Reid, M. Burke, X. Wang, L.J. Rowland, N. Bassil and A. Brown (2014) Patterns of simple sequence repeats in cultivated blueberries (*Vaccinium* section *Cyanococcus* spp.) and their use in revealing genetic diversity and population structure. *Mol. Breeding* 34: 675-689.
- Boches, P., N.V. Bassil and L.J. Rowland (2005) Microsatellite markers for *Vaccinium* from EST and genomic libraries. *Molecular Ecology Notes* 5: 657-660.
- Boches, P., N.V. Bassil and L.J. Rowland (2006) Genetic diversity in the highbush blueberry evaluated with microsatellite markers. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 131: 674-686.
- Brevis, P.A., N.V. Bassil, J.R. Ballington and J.F. Hancock (2008) Impact of wide hybridization on highbush blueberry breeding. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 133: 427-437.
- Costich, D.E., R. Ortiz, T.R. Meagher, L.P. Bruederle and N. Vorsa (1993) Determination of ploidy level and nuclear DNA content in blueberry by flow cytometry. *Theoretical and Applied Genetics* 86: 1001-1006.
- Darrow, G.M. and D.H. Scott (1954) Longevity of blueberry seed in cool storage. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* 63: 271.
- Draper, A. and J. Hancock (2003) Florida 4B: native blueberry with exceptional breeding value. *J. Am. Pomol. Soc.* 57: 138-141.
- Ehrlenfeldt, M.K. and J.R. Ballington (2012) *Vaccinium* species of section *Hemimyrtilus*: their value to cultivated blueberry and approaches to utilization. *Botany* 90: 347-353.
- Ehrlenfeldt, M.K. and M.R. Hall (1996) Metrical analysis of a putative source for semi- seedlessness in rabbiteye blueberry, *Vaccinium ashei* Reade. *HortScience* 31:272-274.
- Ehrlenfeldt, M.K. and N. Vorsa (2007) Inheritance patterns of parthenocarpic fruit development in highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *HortScience* 42(5): 1127-1130.
- Felsenstein, J. (2002) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6 a3. Dept. Genome Sciences, University of Washington, Seattle, WA
- Galletta, G.J. (1975) Blueberries and cranberries, In: Janick J, Moore JN (eds) *Advances in Fruit Breeding*. Purdue Univ. Press, West Lafayette, pp 154-196.
- Gmitter, F.G. Jr. and K. Ling (1991) Embryogenesis *in vitro* and nonchimeric tetraploid plant recovery from undeveloped Citrus ovules treated with colchicine. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116: 317-321.
- 林 弥栄・古里和夫・中村恒雄 (1987) 原色樹木大図鑑. 北隆館, 東京都. pp.595-600.
- Hinrichsen, P., M. Castro, G. Ravest, G. Rojas, M. Méndez, N.V. Bassil and C. Muñoz (2008) Minimal microsatellite marker panel for fingerprinting blueberry cultivars. In IX International *Vaccinium* Symposium 810: 173-180.
- 平井正志・津呂正人・久保中央 (2005) 八幡高原におけるアラゲナツハゼの遺伝変異. *高原の自然史* 10-11: 91-99.
- 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 Syst. Evol.* 287: 75-84.
- 堀込 充・佐藤正義・太刀川洋一 (1999) ブルーベリー新品種'おおつぶ星'の特性. *群馬園試研報* 4: 29-33.
- 堀込 充・佐藤正義・太刀川洋一・中條忠久 (2000) ブルーベリー新品種'あまつぶ星'の特性. *群馬園試研報* 5: 77-82.
- Hou, D.X. (2003) Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins. *Current molecular medicine* 3: 149-159.
- 入角順平・十合貴之・坂尾こず枝・山本雅史・福留弘康・川口昭二・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. *鹿大農学術報告* 63: 27-38.
- 石川駿二・小池洋男 (2006) ブルーベリーの作業便利帳.

- 農文協, 東京都.
- 伊藤祐司・菅原保英(2009)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.
- 國武久登・津田浩利・高木良心・大野礼成・黒木義一・吉岡克則・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. 園芸学研究 5: 105-110.
- 榎川聡・寧林・井上栄一・木村康夫(2006)ブルーベリー(*Vaccinium* spp.)におけるSSRマーカーの開発. 園学雑 75(別2): 172.
- Laverty, T. and N. Vorsa (1991) Fertility of aneuploids between the 5x and 6x levels in blueberry: The potential for gene transfer from 4x to 6x levels. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116: 330-335.
- Liu, Y.C., S. Liu, D.C. Liu, Y.X. Wei, C. Liu, Y.M. Yang, C. Tao and W.S. Liu (2014) Exploiting EST databases for the development and characterization of EST-SSR markers in blueberry (*Vaccinium*) and their cross-species transferability in *Vaccinium* spp. *Scientia Horticulturae* 176: 319-329.
- Lloyd, G. and B.H. McCown (1981) Commercially-feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by shoot tip culture. *Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 30: 421-427.
- Luby, J.J., J.R. Ballington, A.D. Draper, K. Pliszka and M.E. Austin (1991) Blueberries and cranberries (*Vaccinium*), In: Moore JN, Ballington JR (eds) Genetic resources of temperate fruit and nut crops. *Acta Hort.* 290:393-456.
- Lyrene, P.M. (1988) Fecundity of crosses between tetraploid and hexaploid *Vaccinium*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 113: 592-595.
- Lyrene, P.M. (1997) Value of various taxa in breeding tetraploid blueberries in Florida. *Euphytica* 94: 15-22.
- Lyrene, P.M. and J.R. Ballington (1986) Wide hybridization in *Vaccinium*. *HortScience* 21: 52-57.
- Lyrene, P.M., N. Vorsa and J.R. Ballington (2003) Polyploidy and sexual polyploidization in the genus *Vaccinium*. *Euphytica* 133: 27-36.
- Mainland, C.M. and P. Eck (1968) Growth regulator survey for activity in inducing parthenocarpy in the highbush blueberry. *HortScience* 3: 170-172.
- 牧野富太郎(1989)改訂増補牧野新日本植物図鑑. 北隆館, 東京都. pp 547-550.
- 宮下千枝子・石川駿二(2008)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の種間雑種の高pH土壌適応性. *東京農総研報* 3: 57-65.
- 宮下千枝子・石川駿二・平田豊・三位正洋(2006)5倍体ブルーベリーの倍数性キメラにおける細胞層構成の解析. *育種学研究* 8(別2): 169.
- Miyashita, C., S. Ishikawa and M. Mii (2009) *In vitro* induction of the amphiploid in interspecific hybrid of blueberry (*Vaccinium corymbosum* x *Vaccinium ashei*) with colchicine treatment. *Scientia Horticulturae* 122: 375-379.
- Miyashita, C., M. Mii, T. Aung and I. Ogiwara (2012) Effect of cross direction and cultivars on crossability of interspecific hybridization between *Vaccinium corymbosum* and *Vaccinium virgatum*. *Scientia Horticulturae* 142: 1-6.
- Moore, J.N., D.H. Scott and H. Dermen (1964) Development of a decaploid blueberry by colchicine treatment. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 84: 274-279.
- Notsuka, K., T. Tsuru and M. Shiraiishi (2000) Induced polyploid grapes via *in vitro* chromosome doubling. *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 69: 543-551.
- 岡本武・鈴木太美雄・榎川聡・本間貴司・東尾久雄・井上栄一(2012)ブルーベリーのSSRマーカーによるスノキ属野生種の分類. *園学研* 11(別2): 299.
- Perry, J.L. and P.M. Lyrene (1984) *In vitro* induction of tetraploidy in *Vaccinium darrowi*, *V. elliotii*, and *V. darrowi* x *V. elliotii* with colchicine treatment. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 109: 4-6.
- Powell, E.A. and K.A. Kron (2002) Hawaiian blueberries and their relatives-A phylogenetic analysis of *Vaccinium* sections *Macropelma*, *Myrtillus*, and *Hemimyrtillus* (*Ericaceae*). *Systematic Botany* 27: 768-779.
- Qu, L., J. Hancock and J.H. Whallon (1998) Evolution in an autopolyploid group displaying predominantly bivalent pairing at meiosis: genomic similarity of diploid *Vaccinium darrowi* and autotetraploid *V. corymbosum* (*Ericaceae*). *Am. J. Bot.* 85: 698-703.
- Rowland, L.J., S. Mehra and R. Arora (2002) Identification of molecular markers associated with cold tolerance in blueberry. In XXVI International Horticultural Congress: Biotechnology in Horticultural Crop Improvement: Achievements, Opportunities and Limitations pp59-69.
- Rowland, L.J., S. Mehra, A.L. Dhanaraj, E.L. Ogden, J.P. Slovin and M.K. Ehlenfeldt (2003) Development of

- EST-PCR markers for DNA fingerprinting and genetic relationship studies in blueberry (*Vaccinium*, section *Cyanococcus*). *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 128: 682-690.
- Rowland, L.J., E.L. Ogden and M.K. Ehlenfeldt (2010) EST-PCR markers developed for highbush blueberry are also useful for genetic fingerprinting and relationship studies in rabbiteye blueberry. *Scientia Horticulturae* 125: 779-784.
- Sarwar, A., T. Ito and H. Takahashi (2006). An overview of pollen morphology and its relevance to the sectional classification of *Vaccinium* L.(*Ericaceae*). *Jpn. J. Palynol.* 52: 15-34.
- 佐竹善輔・原 寛・亘利俊次・富成忠夫 (1999) 日本の野生植物 木本 II. 平凡社, 東京都. pp 150-156.
- 車 敬愛・鈴木 栄・石川駿二・小池洋男・荻原勲 (2009) ブルーベリー3種64品種の東京における果実の成熟と品質特性. *園芸学研究* 8: 257-265.
- 執行みさと・具志堅文・桂川明広・臂光 昭・吉岡克則・鹿毛哲郎・國武久登・小松春喜 (2014) 我が国自生スノキ属野生種クロマメノキとハイブッシュブルーベリー‘ブルークロップ’との節間交雑から得られたF1系統の評価. *園芸学研究* 13(2): 97-106.
- Stushnoff, C. and L.F. Hough (1968) Response of blueberry seed germination to temperature, light, potassium nitrate and coumarin. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* 93: 260?266.
- 玉田孝人 (2008) ブルーベリー生産の基礎. 養賢堂, 東京都.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- 津田浩利・小島祥子・大坪早貴・小松春喜・國武久登 (2014) 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. *園芸学研究* 13(1): 1-9.
- 津田浩利・小島祥子・鉄村琢哉・小松春喜・國武久登 (2012) オリザリンおよびコルヒチン処理によるスノキ属植物における倍数体の作出. *園芸学研究* 11: 205-212.
- 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. Am. Soc. Hort. Sci.* 138: 317-324.
- 津田孝範・須田郁夫・津志田藤二郎 (2009) アントシアニンの科学ー生理機能・製品開発への新展開ー. 建帛社, 東京都.
- Tsutsumi, C. (2011) The Phylogenetic Positions of Four Endangered *Vaccinium* Species in Japan. *Bull. Natl. Mus. Nat. Sci. Ser. B* 37: 79-86.
- Vander Kloet, S.P. and T.A. Dickinson (1992) The taxonomy of *Vaccinium* section *Hemimyrtillus*. *Bot. Mag.* 105: 601-614.
- Vander Kloet, S.P. and T.A. Dickinson (1999) The taxonomy of *Vaccinium* section *Myrtillus* (*Ericaceae*). *Brittonia* 51: 231-254.
- Vorsa, N., G. Jelenkovic, A.D. Draper and W.V. Welker (1987) Fertility of 4x X 5x and 5x X 4x progenies derived from *Vaccinium ashei/corymbosum* pentaploid hybrids. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 112: 993-997.
- Yagi, M., T. Kimura and O. Yamamoto (2009) Estimation of ploidy levels and breeding backgrounds in pot carnation cultivars using flow cytometry and SSR markers. *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 78: 335-343.
- 八幡茂木・佐藤三郎・小原 均・松井弘之 (2004) アミプロフォスメチルおよびコルヒチンによるビワ四倍体の作出. *園芸学研究* 3(4): 339-344.
- 山崎 敬 (1989) ツツジ科. 佐竹義輔・原 寛・亘利俊次・富成忠雄編, 日本の野生植物ー木本 II. 平凡社, 東京都. pp 122-156.
- 山崎麻南登・渡邊美帆・仲西 藍・帆足崇道・車 敬愛・堀内尚美・荻原 勲 (2015) 閉鎖系栽培室を利用したブルーベリーの幼若期間の短縮化. *園学研* 14(別1): 297.
- Yamazaki, T. (1993) *Ericaceae*. In: Iwatsuki K, Yamazaki T, Boufford DE, Ohba H (eds) *Flora of Japan*, Vol IIIa, Angiospermae Dicotyledoneae Sympetalae (a). Kodansha, Tokyo, pp 6-63.
- 安田喜一・國武久登・中川匠子・黒木宏憲・八幡昌紀・平田力也・吉倉幸博・川上郁夫・杉本安寛 (2008) ニンポウキンカン‘勇紅’の倍数性周縁キメラの証明とその形態的特性. *園芸学研究* 7: 165-171.

Summary

Genetic classification in *Vaccinium* including blueberries and Japanese wild species, and application of their interspecific hybrids for breeding*

Chieko Miyashita**

Tokyo Metropolitan Agriculture and Forestry Research Center

Highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*) is one of the main species of blueberries, which is adapted to cold areas; its economic cultivation in warm areas is difficult. Therefore, in the USA, interspecific hybridization was performed between *V. corymbosum* and *V. darrowi*, which is native to the south area of the USA. The interspecific hybrids thus obtained were used to develop the southern highbush blueberry cultivars, which show adaptability to warm areas. In Japan, many wild *Vaccinium* species are available, such as Munin-shashanbo (*V. boninense*) which is native to subtropical areas; these species are considered suitable to develop cultivars that can adapt to the environmental condition in Japan. However, information on the genetic relationships and cross-compatibility among many Japanese wild species is limited. Therefore, using these species as breeding materials is difficult. In this study, the genetic relationships, ploidy levels, and interspecific hybridization crossability among Japanese wild *Vaccinium* species were evaluated for the application of interspecific hybrids thus developed for blueberry breeding. The following results were obtained.

1. Single sequence repeat (SSR) polymorphism analysis was performed using the markers developed for *V. corymbosum* to evaluate the genetic relationships and ploidy levels of 22 *Vaccinium* species, including 15 Japanese wild species. The estimated alleles were detected in 249 (94%) of the 264 combinations of all species and markers. In a dendrogram generated based on the SSR polymorphism, the distribution of the species was generally consistent with the conventional morphological classification. In addition, the ploidy levels of 21 species estimated based on the maximum number of alleles per plant were consistent with the flow cytometry analysis results of our and previously reported studies. Thus, the SSR markers developed for *V. corymbosum* can be used to estimate the polymorphisms, genetic relationships, and ploidy levels of a wide range of *Vaccinium* species, including Japanese wild species.
2. Reciprocal diallel crosses among 8 *Vaccinium* plants, including Japanese wild species, were performed to evaluate the crossability. In blueberry species, reciprocal crosses were set between *V. corymbosum* (4x) and *V. virgatum* (rabbiteye blueberry, 6x), and interspecific hybrids were obtained from both 4x × 6x and opposite crosses. Among 2 blueberry species and 6 wild species (2x), including 1 interspecific hybrid, total 24 cross combinations were established, and a hybrid was obtained from the cross between TO-303 × *V. corymbosum*. TO-303 (2x) is an interspecific hybrid derived from the diploid wild species (*V. darrowi* and *V. elliottii*) native to south area of the USA. Therefore, the hybrid between TO-303 and *V. corymbosum* was produced using interploid crossing. Among 6 wild species, including one hybrid, total 30 cross combinations were established, and hybrids were obtained from 8 crosses. Three of these hybrids had TO-303 as the seed parent, and 3 Japanese wild species that belonged to different sections from those of

the parent species of TO-303 as pollen parents. These results suggested that obtaining interspecific hybrids was relatively easier between species that have the adjacent ploidy level and belong to the same section, such as *V. corymbosum* and *V. virgatum*, but difficult between species with different ploidy levels belonging to different sections, such as blueberry species and diploid Japanese wild species. Moreover, in interspecific hybridization, the influence of ploidy level on crossability was thought to be greater than that of genetic relationships. However, TO-303 had wide crossability irrespective of the difference in section or ploidy level. The hybrids obtained in this study had various useful characteristics derived from the parent species, but they generally had low fertility. Therefore, restoring the fertility of the hybrids was necessary to use them as breeding material.

3. In order to overcome the cross-sterility between species with different ploidy levels and the low fertility of hybrids, we attempted to establish an efficient method to induce polyploids in the *Vaccinium* plants. The polyploid from *V. boninense* ($2x$) and the amphidiploid from *V. boninense* \times *V. wrightii* interspecific hybrid ($2x$) could be induced by using the *in vitro* colchicine treatment method for blueberry. The polyploid induction method has been shown to yield successful results with high efficiency (5.6-50.0%) for several species. Therefore, this method might be useful for many other *Vaccinium* species. In addition, some of the induced polyploids retained fertility to some extent. This result indicates that the polyploids could be used as breeding materials.

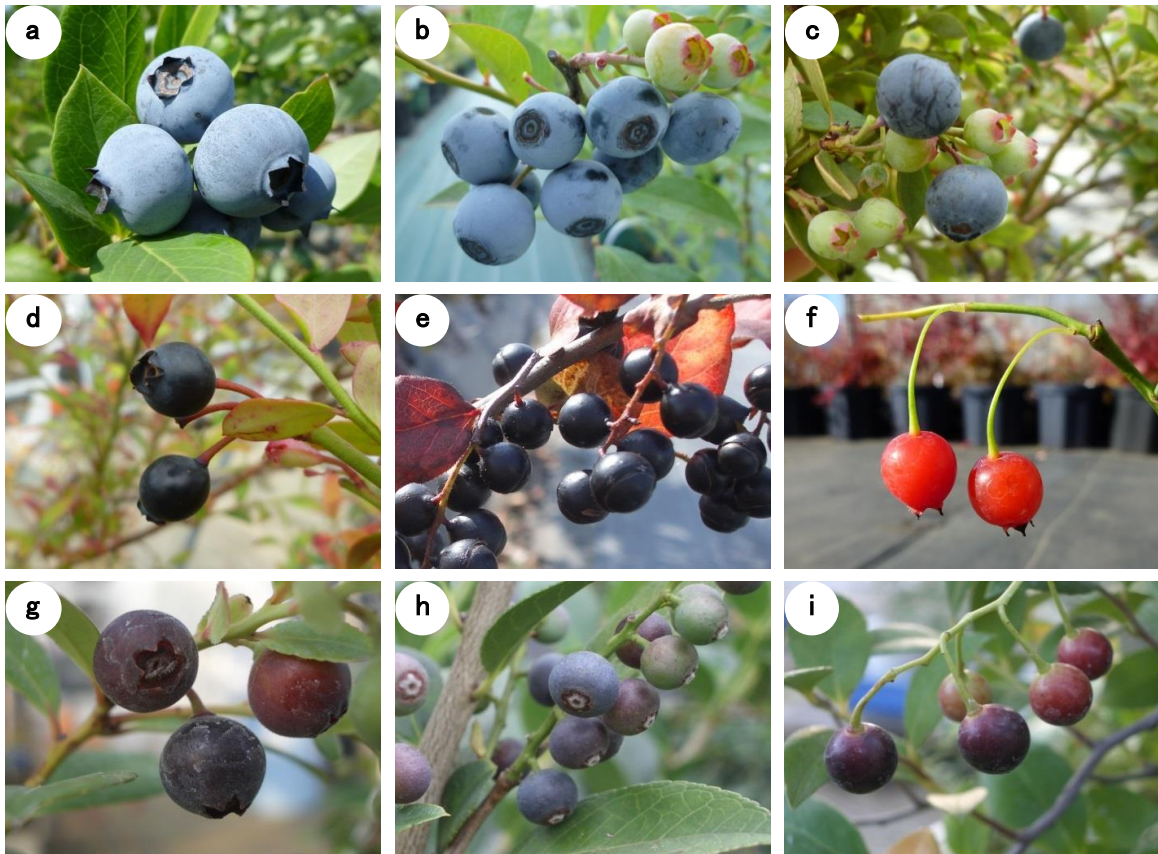
In conclusion, three methods were proposed for the successful interspecific hybridization between Japanese wild species ($2x$) and *V. corymbosum* ($4x$). The first method involves the use of polyploid ($4x$) derived from Japanese wild species ($2x$). Polyploid plants having crossability with *V. corymbosum* could be obtained if numerous polyploid populations are produced by using the *in vitro* colchicine treatment method. The second method involves the use of TO-303 as a bridge plant: hybrids ($2x$) between Japanese wild species and TO-303 are produced and then crossed with *V. corymbosum*. None of the hybrids induced in this study was fertile. However, hybrid plants having crossability with *V. corymbosum* such as TO-303 might be obtained by producing many hybrid plants. In the case of the unfertile hybrids, the third method involves the use of amphidiploids of the hybrids. Fertility might be restored in amphidiploids induced by the *in vitro* colchicine treatment method.

Keywords: blueberry breeding, Japanese wild species, *Vaccinium* spp., DNA analysis, interspecific hybrid

Bulletin of Tokyo Metropolitan Agriculture and Forestry Research Center, 12:1-58, 2017

* Doctorial dissertation, Tokyo University of Agriculture and Technology.

** Corresponding author: c-miyashita@tdfaff.com



図版 1-1 *Vaccinium* 属種および種間雑種の果実

a) *V. corymbosum* (ハイブッシュ)

b) *V. virgatum* (ラビットアイ)

c) *V. darrowi*

d) *V. darrowi* × *V. elliotii* (TO-303)

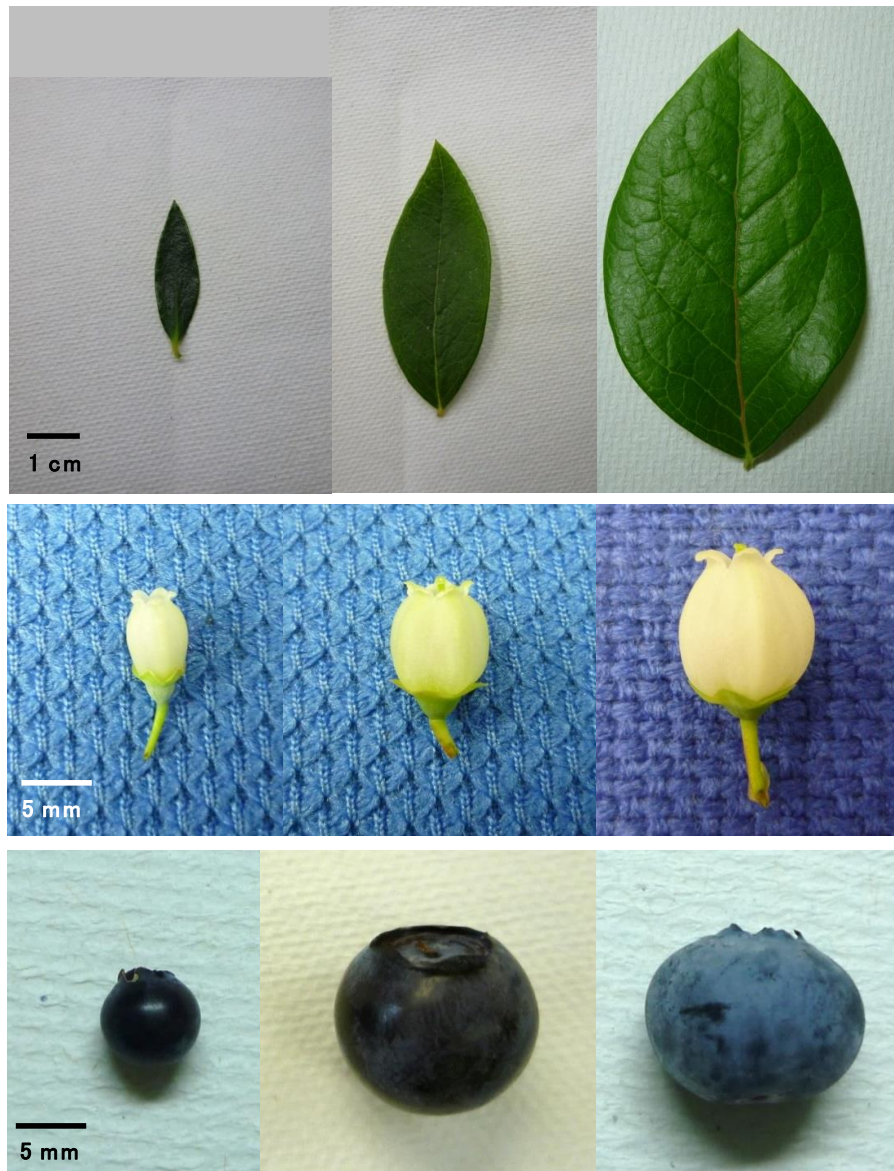
e) *V. oldhamii* (ナツハゼ)

f) *V. japonicum* (アキシバ)

g) *V. boninense* (ムニンシヤンヤンボ)

h) *V. bracteatum* (シヤンヤンボ)

i) *V. wrightii* (ギーマ)



♀
TO-303

F₁
TEa-1

♂
V. corymbosum

図版 3-2 雑種 TO-303 × *V. corymbosum* の形態



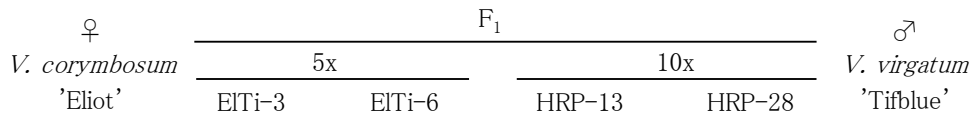
図版 3-3 雑種 TO-303 × *V. oldhamii* の形態



図版 3-4 雑種 TO-303 × *V. boninense* の形態



図版 4-1 *V. boninense* および *V. boninense* × *V. wrightii* の倍数体の形態



図版 4-2 種間雑種 *V. corymbosum* × *V. virgatum* の複倍数体の形態