

原著論文

パッションフルーツ (*Passiflora edulis*) の自家和合性特異的 DNA マーカーの開発

伊礼彩夏¹・太郎良和彦¹・阿波根直恭²・松村まさと²・澤岬哲也²
・正田守幸³・玉城 聡⁴・浦崎直也¹

- 1 沖縄県農業研究センター
- 2 沖縄県農業研究センター名護支所
- 3 沖縄県農林水産部農林水産総務課
- 4 沖縄県中部農業改良普及センター

要 約

パッションフルーツ (*Passiflora edulis*) の育種の効率化のため、自家和合性個体識別 DNA マーカーの開発を行った。自家和合性の系統 2-4-4 (母本) と 7-4-23 (父本) の交配により得た F1 集団は、自家和合性と自家不和合性の個体比が 3:1 となり ($p=0.44$)、交配親は孢子体型自家不和合性であると推定された。次に系統 2-4-4 と系統 7-4-23 の交配により得られた自家和合性 F1 および自家不和合性 F1 のバルク DNA を用いて、restriction-site-associated DNA sequencing (RAD-seq) 解析を行った結果、6300 万個以上の RAD タグが得られた。その中から、自家和合性特異的な RAD タグ SC22360 が得られ、概要ゲノム配列から SC22360 と高い相同性を示す配列を含む contig_158866 が得られた。SC22360 と相同な配列の周辺領域に特異的なプライマーを設計することにより、PCR によって増幅する A および B の自家和合性特異的 DNA マーカー (SC_In/Del) を得た。SC_In/Del が A と B の場合は自家和合性、B と B のホモの場合は自家不和合性と判別することができた。育種集団に適用できるか検証するため、3 つの交配実生集団 364 個体について、幼苗期に SC_In/Del 型を調べた結果、286 個体が自家和合性と判定された。さらに、自家和合性と判定された 209 個体を温室で栽培し、表現型を調査したところ、SC_In/Del 型と表現型は約 93% で一致した。以上のことから、パッションフルーツの自家和合性特異的 DNA マーカー SC_In/Del は、自家和合性個体の選抜に活用できる。

キーワード : RAD-seq, 自家不和合性, 孢子体型不和合性

緒 言

パッションフルーツ (和名:クダモノトケイソウ, *Passiflora edulis*) は、中南米を原産とするトケイソウ科 (Passifloraceae) のつる性植物で、果実内の仮種皮を種子ごと食す果物である。仮種皮は、ゼリー状で、独特の芳香と甘酸っぱさを特徴としている。生食以外では、希釈用のジュースやジャム・香料などとして利用される。沖縄県のパッションフルーツの収穫量は、2015 年度で 103t であり、糸満市と恩納村が拠点産地に認定されている (沖縄県農林水産部, 2018)。パッションフルーツの種類については生産者独自の交配で得られた多くの系統が存在し (松田ら, 2005)、経済的に栽培されているのはほとんど交雑種である (沖縄農業会議, 2011)。

パッションフルーツの遺伝資源には、自身の花粉で受精が成立する自家和合性と他個体の花粉で人工受粉を必要とする自家不和合性のものが存在する (Rêgo *et al.*, 1999)。自家不和合性の品種や系統では、交雑親和性のある品種を混植する必要があるため、自家和合性の品種と比較すると受粉作業に多くの時間がかかるなど栽培管理が重労働になる場合があるため、生産現場では栽培作業の省力化の観点から自家和合性の品種が求められている。

パッションフルーツは本県の戦略品目に位置付けられており、様々な優良形質を持つ個体の選抜育種が行われている。近年では 2012 年から開始された次世代沖縄ブランド作物特産化推進事業において、自家和合性で着果性の良い省力型品種を育種目標として品種開発が行われている。育種は交雑によって行われるが、自家和合性個体の自殖後代でも自家不和合性個体が出現する。自家和合性判定には、種子の発芽から着果確認まで約 1 年の期間を要する。加えて、選抜育種は施設栽培で実施されるため、植付け本数に限りがあることから、定植時までには自家和合性個体を判別できる技術が求められている。育苗期に自家和合性・不和合性を判定できる DNA マーカーを開発できれば、自家和合性個体のみを面積の限られた施設に栽培することができるため、初期選抜の効率が上がり和合性育種が進展することが期待される。

植物の自家不和合性は、花粉 (n) の遺伝子型そのもので決定される配偶体型自家不和合性と、親である孢子体 (2n) によって決定される孢子体型自家不和合性が存在し (藤本ら, 2011)、これは一般的に S と表記される一つの遺伝子座で制御され、その遺伝子座には多くの対立遺伝子が存在する (Madureira *et al.*, 2014)。配偶体型自家不和合性の植物

としてナス科 (Solanaceae) やバラ科 (Rosaceae), 胞子体型自家不和合性ではアブラナ科 (Brassicaceae) やキク科 (Asteraceae) などが知られている. パッションフルーツの自家不和合性は, 胞子体型と配偶体型の2因子制御であることが報告されている (Suassuna *et al.*, 2003). 配偶体型自家不和合性は, 雌ずいと同じ遺伝子型の花粉では受精が行われず不和合性となり, 胞子体型自家不和合性では花粉と雌ずいのS対立遺伝子が共優性の場合, 自家不和合となる (Hiscock and Tabah, 2003).

近年, 次世代シーケンサーの登場により, イネやシロイヌナズナなど全ゲノムが解読されたモデル植物のみならず, ゲノム情報が少ない非モデル植物においてもDNAマーカー開発を可能とする restriction-site-associated DNA sequencing (RAD-seq) 法が開発された (Baird *et al.*, 2008). 従来まで非モデル植物ではDNAマーカー開発が困難であったが, 本手法により, ニガウリの雌性型判別DNAマーカー (Matsumura *et al.*, 2014) や, パインアップルのトゲ型判別DNAマーカー (Urasaki *et al.*, 2015) など, 様々な非モデル植物でDNAマーカーが開発されている. また, 果樹の自家和合性DNAマーカーにおいては, ニホンナシ (Okada, 2015) やオウトウ (Ikeda *et al.*, 2004) などのバラ科植物で自家和合性個体を識別可能なDNAマーカーが開発されているが, パッションフルーツ自家和合性特異的なDNAマーカーの報告はない.

本研究では, 始めに自家和合性の系統同士の交配によりF1集団を育成し, 自家和合性個体と自家不和合性個体の分離比から, 供試材料の不和合性が配偶体型と胞子体型のどちらであるか判定した. その後RAD-seq解析を実施し, 自家和合性特異的DNAマーカーの開発に取り組んだ. さらに開発したDNAマーカーを育種集団に適用し, DNAマーカーの実用性の検証を行った.

材料および方法

供試材料および自家和合性型推定

自家和合性の紫系統3を母本, 自家不和合性の黄系統H231を父本として得られた後代から選抜された自家和合性系統2-4-4および7-4-23を交配親として用いた. そして2-4-4を母本, 7-4-23を父本として得られた45個体のF1を材料に用いた. 人工交配は農業研究センター名護支所において2014年3月から4月にかけて行った. まず母本に供試した2-4-4の花については, 交配前に除雄を行った. 開花当日の9:00~11:00に父本の葯をピンセットで採取し, 母本の柱頭に受粉した. 得られたF1種子の自家和

合性または自家不和合性を確認するため温室で栽培した. その後, 各個体5花以上に自家受粉を行い, 3果以上着果したF1の株を自家和合性(SC), まったく着果しなかった株を自家不和合性(SI)と判定した(表1のbに注釈として記載). その後得られた分離比から, 両親の遺伝子型を推定し, 自家不和合性が胞子体型と配偶体型のどちらかであるか推定した.

DNA抽出およびRAD-seq解析

2-4-4と7-4-23のF1各個体のDNAは, 若葉からDNeasy Plant Mini Kit (キアゲン社) を用いて抽出した. DNAを抽出後, 自家和合性36個体のDNAと自家不和合性9個体のDNAをそれぞれバルク(混合)し, 両親と2つのバルクDNAのRAD-seq解析を実施した. RAD-seqライブラリーの調製は, Tru-seq DNA PCR-Free LT Sample Prep Kit (Illumina社) を用いた. DNAの切断には, 制限酵素 *MseI* と *NlaIII* (NewEngland Biolabs社) を用いた. ライブラリーのシーケンシングはHiSeq2500 (Illumina社) を用い, ペアエンドシーケンシング(100 bp × 2) で実施した. 得られたシーケンシングデータは, クオリティスコアに基づき, 各リードの3'末端から30塩基を削除し, 70 bpのリードをRADタグと定義した. RADタグ数と種類を4サンプル間で比較して, 自家和合性に特異的なRADタグを選抜した.

自家和合性特異的RADタグのDNAマーカーへの変換とPCR条件

自家和合性特異的なRADタグの周辺配列を, 紫系統パッションフルーツの概要ゲノム配列(未発表)より抽出した. 抽出のためのプログラムはBLASTを用いた. 次に, 抽出した配列を参考にし, RADタグ配列の5'上流と3'下流にプライマーを設計した. RADタグのマーカー化は, 設計したプライマーを用いてPCRによって増幅後, アガロースゲル電気泳動でバンドを検出する方法で行った. 変換したDNAマーカーは, RAD-seq解析の材料として用いた45個体のF1を材料にして, PCRを実施し, DNAマーカー型と表現型の連鎖を調べた.

PCRは鋳型DNA 1 μlを含む合計25 μlの反応液量で実施し, DNAポリメラーゼはKOD FX (東洋紡) を用いた. 反応液組成はメーカーの推奨条件に従った. 増幅条件は, 94 °Cで5分の熱変性後, 熱変性94 °C, 10秒, アニーリング55 °C, 10秒, 伸長反応68 °C, 1分間を1サイクルとして40サイクル, 最終68 °Cで5分行った. 増幅産物は1.5%アガロースゲルで, 100 V, 30分間の電気泳動(0.5 × Tris-Borate-EDTA buffer)を行い, 臭化エチジウムで染色後, 紫外線下(354 nm)で検出した.

表1 パッションフルーツの交配試験の結果およびRAD-seq解析の概要

	母本 2-4-4	父本 7-4-23	F1		p値 ^a
			SCバルク	SIバルク	
個体数			36	9	0.44
表現型 ^b	SC	SC	SC	SI	
遺伝子型 ^c	<i>SIS2</i>	<i>SIS3</i>	<i>SIS1, SIS2, SIS3</i>	<i>S2S3</i>	
RADタグ数	72,063,118	99,684,808	95,607,960	63,066,729	
RADタグの種類	3,141,403	4,192,046	3,407,066	2,338,955	

^a 予想される分離比3 : 1 (SC:SI) でカイ二乗検定を実施した。

^b SCとSIはそれぞれ自家和合性および自家不和合性を表す。F1の自家不和合性を確認するために、5花以上に自家受粉を行い、3果以上着果したF1の株をSC、着果しなかった株をSIとした。

^c 遺伝子型は、F1における自家和合性の分離比から推定した。SIはSCの対立遺伝子であると考えられた。

		7-4-23♂(<i>SIS3</i>)	
		<i>SI</i>	<i>S3</i>
2-4-4♀ (<i>SIS2</i>)	<i>SI</i>	<i>SIS1</i>	<i>SIS3</i>
	<i>S2</i>	<i>SIS2</i>	<i>S2S3</i>

図1 自家和合性系統2-4-4と7-4-23の受精時における推定S遺伝子型および表現型の分離

表現型 ○ は自家和合性、⊖ は自家不和合性を示す。表現型の分離比はSC:SI=3 : 1となる。SI, S2そしてS3は2-4-4と7-4-23のF1の分離比より推定したS遺伝子型を表す。

DNA マーカーの検証

作製したDNAマーカーの有効性を調べるため、沖縄県農業研究センター名護支所で保存・維持されている自家和合性の農大紫1、サマークイーン、ルビースター、ハクホウ、自家不和合性のMTKG、キングルビー、南十字星の7種類の系統を用いて、作製したDNAマーカーによる自家和合性個体の識別を実施した。なお、近年これら7種類の系統について、SSR (simple sequence repeats) マーカー解析による品種識別が実施され、農大紫1とサマークイーン、ハクホウとルビースターは、同一であるとされている(未発表)。さらに他の育種集団に適用できるか検証するため、12-4-8×農大紫、農大紫×12-4-8、および農大紫×12-5-10のF1個体について、DNAマーカーによる自家和合性判定を実施した。なお、12-4-8および12-5-10は南十字星を母本、1-1-14を父本として得られた後代である。交配は2016年12月から2017年1月の期間において開花当日の13:00~15:00に行った。母本に供試する自家和合性系統の花については交配前に除雄を行い、花粉の混入を避けるため、交配組み合わせごとに70%エタノール溶液で手指を消毒して交配を行った。得られた

F1を播種後、幼苗期に葉からDNAを抽出し、作製したDNAマーカーによる自家和合性個体の識別を行った。自家和合性と判定され、生育の良い個体のみを温室で栽培し開花が認められた個体について、自殖により表現型を調査後、作製したDNAマーカーの判定結果と比較し、一致率を算出した。

結果

自家不和合性型推定

自家和合性の系統2-4-4(母本)と7-4-23(父本)の交配により得られたF1の和合性・不和合性の分離を表1に示した。自家和合性と自家不和合性の個体がそれぞれ36個体と9個体存在し、3:1の分離比に合致した(p=0.44)。これらの結果から交配親とF1のS遺伝子型について2-4-4は*SIS2*、7-4-23は*SIS3*と推定した(表1, 図1)。

RAD-seq解析の概要

交配親と2つのF1バルクDNA合計4サンプルを用いてRAD-seq解析を行った。その結果、RADタグ数およびRADタグの種類は交配親の系統2-4-4(母本)と7-4-23(父本)からそれぞれ、72,063,118個、3,141,403種類と99,684,808個、4,192,046種類が得られた。F1では自家和合性サンプルから95,607,960個、3,407,066種類、自家不和合性バルクサンプルから63,066,729個、2,338,955種類のRADタグが得られた(表1)。

自家和合性特異的RADタグの抽出とDNAマーカーへの変換

RAD-seq全データから、両親と自家和合性のF1バルクサンプルにのみ存在するRADタグの抽出を行った。その結果、40万種類を超えるRADタグが得られ、それらをSCタグと名付けた。SCタグ

表2 DNAマーカー化した自家和合性特異的なRADタグのID, タグ配列および各個体間のRADタグ数

ID	タグ配列	RADタグ数			
		交配親 ^a		F1	
		2-4-4	7-4-23	SCバルク ^b	SIバルク ^c
SC22360	GCCCGAATTTGTTAGGTTTGTGTTTGAATGTTGCC TTGTATGGTTTGGGGTTCGGTCTTTCTAGAGCC	29	11	23	0

^a 2-4-4(母本)と7-4-23(父本)ともに自家和合性である。

^b 自家和合性(=SC)のF1(36個体)のDNAを混合したサンプル。

^c 自家不和合性(=SI)のF1(9個体)のDNAを混合したサンプル。

GAAATGAAAAACGATTTCCAAGTAAGTTATGTTTTATTGCCATATGGTTTGCCAGTG 60
 CCTTATGTTCTCAACATGTTTGCATGCTCAGTTTCTCCTCACTGAGTACCTTTGTGT 120
 ACTTCACCCTCTCAGTTGGTTTCCCCTTTTCAGGTGTTCTGTCTTTGATGTGGTTGCC 180
 GTGGTGAAGTCGTCGTTAGAGGTTTGTCTTGGCGCTACTCTCATGTAATGTTATCGGAG 240
 GTGTTATTGCATACATGCCATTCTTACTAGAGCATCATCAGCATGTTTGGACAAATGTC 300
 ATGTCGGCTATGTGTAGCCTAGGTTGATTGAGTTTTGTACCGCTGCATACTCCGAGTTT 360
 TTAATGAAGCCATGCTCTTATTTTTTAAAAATCCATTTGTTGATTTCTATTGTTTA 420
 TATATTTGAGATGGCCGAAATTTTGTGGTTTTCGTTGATGAGTGTCCCTGTATGGT 480
 TTGGGTTTCGGTTCTCTAGAGCCAAACCGTAACCGTACGGCAGGAGGGAAGGGTGAAC 540
 TGTGGATTGGGTATGCCAAGATCCAATTTGGATATTGTAAGACATCGTTGATATGT 600
 TAAGTTATAAAAAGGAAAGGCTTAATTGATATTTTATGTTAATCCAATCTCGAAATTAAT 660
 CTAGGATTAAGTAAATGTGCTCTGTAGTATACGCTCGGTTTTGCAAAAGTGTGAGAT 720
 ACCGACGTACAGACTTATACTACGAATAAAAGTGTCCCTGGTCCAACCGTTTNAATGAA 780
 CGAGGACAGTAAAACCCGTGGATCCGTTGATGAATGATGACTTATGTCTTATCGGTC 840
 ATGGACTTGGAGAAGTCAAATTCATCACTGATATCCTATTGTGCAATAGCATATCGGA 900
 TCGACCATGTGAGATCGCTCCATAGGTGATGTCATCATGACCTCGATCTCAATGTAAC 960
 ATGTG 965

グとそのアレル配列を RAD-seq 解析の全データより抽出し、その中から 20 種類の SC タグをランダムに選択して DNA マーカー化を試みた。その結果、SC22360 と名付けた RAD タグが得られ (表 2)、紫系統パッションフルーツの概要ゲノムから SC22360 と相同な配列を抽出すると contig_158866 が得られた (図 2)。SC22360 と相同配列の周辺領域に設計したプライマーセット S3tag7693F (5' -ACTAGAGCATCATCAGCATG-3') と S3tag7693R (5' -TCTGTACGTCGGTATCTCAC-3') を用いた PCR により、約 470bp と約 350bp の DNA が増幅された (図 3)。それぞれ約 470 bp のバンドを SC_In/Del_A、約 350 bp のバンドを SC_In/Del_B と名付けた。RAD-seq 解析に用いた F1 の SC_In/Del 型を調査した結果、自家和合性 36 個体中の 35 個体から SC_In/Del_A と B の両方が増幅された。一方、自家不和合性 9 個体中の 8 個体からは SC_In/Del_B のみが増幅されたことから、SC_In/Del 型と自家和合性遺伝子または自家不和合性との連鎖が確認された (表 3)。他の 19 種類の RAD タグ周辺領域に設計したプライマーセットでは連鎖は確認できなかった。

図 2 SC22360 のタグ配列と相同な配列が存在したコンティグ (contig_158866) と設計したプライマー配列。下線部分は相同配列を示し、矢印は設計したプライマー配列を示す。

DNA マーカー SC_In/Del の検証

DNA マーカー SC_In/Del 型の有効性を調べるため、沖縄県農業研究センター名護支所に保存されている

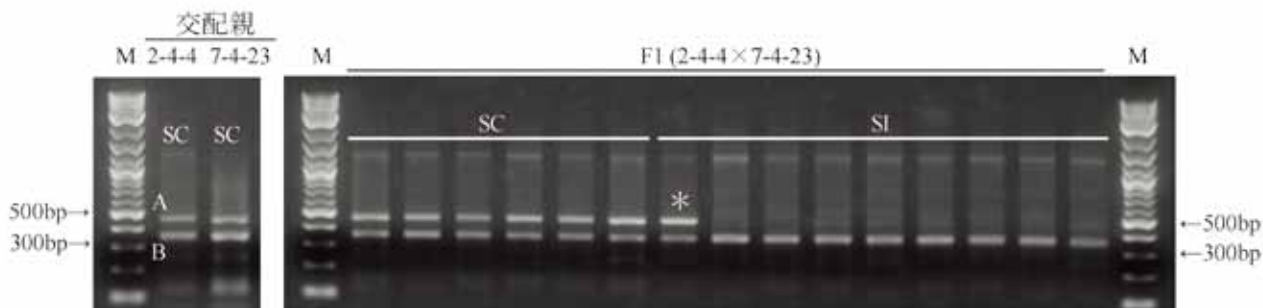


図 3 自家和合性特異的な SC22360 から変換した DNA マーカー SC_In/Del
 M は分子量マーカー (2-log DNA Ladder Marker, New England Biolabs) である。SC と SI は、それぞれ自家和合性と不和合性を示す。* は組換え個体を示す。バンドが増幅された A と B を SC_In/Del_A と SC_In/Del_B と名付けた。

表3 F1^aにおけるSC_In/Del型の個体数

表現型 ^b	個体数	SC_In/Del型		
		SC_In/Del_A/A	SC_In/Del_A/B	SC_In/Del_B/B
SC	36	0	35	1
SI	9	0	1	8

^aF1はパッションフルーツ自家和合性系統2-4-4(母)と7-4-23(父)の交配により得られた。

^bSCは自家和合性，SIは自家不和合性を示す。

表4 既存遺伝資源の表現型とSC_In/Del型による自家和合性・自家不和合性の比較

系統名 ^a	育成地(由来) ^b	表現型 ^c	SC_In/Del型
農大紫1	不明	SC	SC_In/Del_A/B
サマークイーン	奄美大島	SC	SC_In/Del_A/B
ルビースター	台湾	SC	SC_In/Del_A/B
ハクホウ	不明	SC	SC_In/Del_A/B
MTKG	不明	SI	SC_In/Del_B/B
キングルビー	石垣	SI	SC_In/Del_B/B
南十字星	不明	SI	SC_In/Del_B/B

^aSSRマーカー解析による品種識別結果から，農大紫1とサマークイーン，ルビースターとハクホウは同一とされている(未発表)。

^b熱帯果樹の栽培(沖縄県農業会議，2011)より引用

^cSCは自家和合性，SIは自家不和合性を示す。

表5 パッションフルーツの交配育種集団におけるSC_In/Del型の調査結果

交配組合せ ^a		個体数	SC_In/Del型		p値 ^b
母本	父本		SC_In/Del_A/B	SC_In/Del_B/B	
12-4-8	農大紫	96	73	23	0.81
農大紫	12-4-8	168	133	35	0.21
農大紫	12-5-10	100	80	20	0.25
合計		364	286	78	

^a交配に用いた材料は全てSC_In/Del_A/Bで自家和合性である。

^b分離比(3 : 1)でカイ二乗検定を実施した。

7種類の遺伝資源を用いて自家和合および自家不和合性の判定を行った。その結果，4種類の自家和合性のDNAマーカー型はSC_In/Del_A/Bで，3種類の自家不和合性のDNAマーカー型はSC_In/Del_B/Bであり，表現型とDNAマーカーの連鎖が確認された(表4)。SSRマーカーによる品種識別により同一とされている農大紫1とサマークイーン，ハクホウとルビースターのDNAマーカー型はSC_In/Del_A/Bであった。

さらに実際の育種集団に適用できるか検証するため，育種のため交配された12-4-8×農大紫，農大紫×12-4-8，そして農大紫×12-5-10の交配組み合わせから得られた実生集団について，SC_In/Del型を調査した。その結果，12-4-8×農大紫は，96個体中73

個体がSC_In/Del_A/Bの自家和合性，23個体がSC_In/Del_Bの自家不和合性，農大紫×12-4-8は，168個体中133個体がSC_In/Del_A/Bの自家和合性，35個体がSC_In/Del_Bの自家不和合性，そして農大紫×12-5-10は，100個体中80個体がSC_In/Del_A/Bの自家和合性，20個体がSC_In/Del_Bの自家不和合性と判定され，いずれの交配組合せにおいても，期待値3 : 1に適合した(表5)。その後，DNAマーカーによって自家和合性個体と判定され，樹勢の良い個体のみを温室で栽培し，自家和合性・不和合性を調査した。その結果，12-4-8×農大紫は，41個体中39個体が自家和合性，2個体が自家不和合性，農大紫×12-4-8は，107個体中99個体が自家和合性，8個体が自家不和合性，農大紫×12-5-10は，61個体中57個体

表6 DNAマーカーによって自家和合性(SC_In/Del_A/B)と判定されたF1の表現型

母本	父本	F1			一致率(%)
		個体数 ^a	表現型 ^b		
			SC	SI	
12-4-8	農大紫	41	39	2	95.1
農大紫	12-4-8	107	99	8	92.5
農大紫	12-5-10	61	57	4	93.4
合計		209	195	14	93.3

^a 得られた交配実生集団のうち、SC_In/Del_A/Bと判定された個体数

^b SC(=自家和合性)は結実が認められた個体、SI(=自家不和合性)は10花以上自家受粉しても結実が認められなかった個体を示す。

が自家和合性、4個体が自家不和合性を示し、全ての交配組み合わせにおいて、DNAマーカーと表現型との一致率は93.3%以上の高い値を示した(表6)。

考 察

植物の自家不和合性のメカニズムは、S遺伝子座で制御され、その遺伝子座には多種類の対立遺伝子が存在する(Madureira *et al.*, 2014)。自家不和合性には半数体の花粉の遺伝子型のみで決定される配偶体型自家不和合性と、親である葯(孢子体)の二倍体遺伝子で決定される孢子体型自家不和合性が存在する(Hiscock and Tabah, 2003)。パッションフルーツは、孢子体型と配偶体型の2因子制御であることがSuassuna *et al.* (2003)によって報告されている。孢子体型自家不和合性では二つの異なる対立遺伝子が発現し、花粉側、雌ずい側のS対立遺伝子が全て共優性の場合自家不和合となるが、S対立遺伝子に優性-劣性関係がある集団は、S対立遺伝子の全てが共優性である集団と比較すると、和合性交配の機会を増やす(Hiscock and Tabah, 2003)。本研究で供試した2-4-4と7-4-23は自家和合性であり、すなわち自家受粉ができるということは、S座に優劣性が存在し、共優性のS対立遺伝子を二つ持っていないことが考えられる。

供試した交配親の推定遺伝子型および表現型を図1および図4に示した。2-4-4、7-4-23には優性のS対立遺伝子の自家和合遺伝子が一つ存在し、この優性のS遺伝子をS1、自家不和合性遺伝子をS2およびS3と仮定する。また、2-4-4と7-4-23の交配で不和合性個体が多量に得られたことから、両親ともにS1のホモではないとする。両親の遺伝子型がS1S2 × S1S3と仮定すると、F1はS1S1(和合性) : S1S2(和合性) : S1S3(和合性) : S2S3(不和合性) = 1 : 1 : 1 : 1となる。すなわち、和合性と不和合性の表現型は3:1で分離することが期待され、実際に得られたF1

の表現型の割合とも期待値に合致する(表1)。また、図2の電気泳動結果では、SC_In/Del_Aと_Bの両方とSC_In/Del_Bのみの個体が出現し、SC_In/Del_Aのみのバンドが出現しなかった。S1からSC_In/Del_Aのバンドが、S2とS3からSC_In/Del_Bのバンドが増幅されるとすると、SC_In/Del_Aのみのバンド(S1ホモ)が確認されないことに矛盾が生じる。そこで、自家和合性遺伝子と仮定したS1からはSC_In/Del_Aと_Bの両方、S2とS3からはSC_In/Del_Bのみのバンドが増幅されるとすると、矛盾が解消される。以

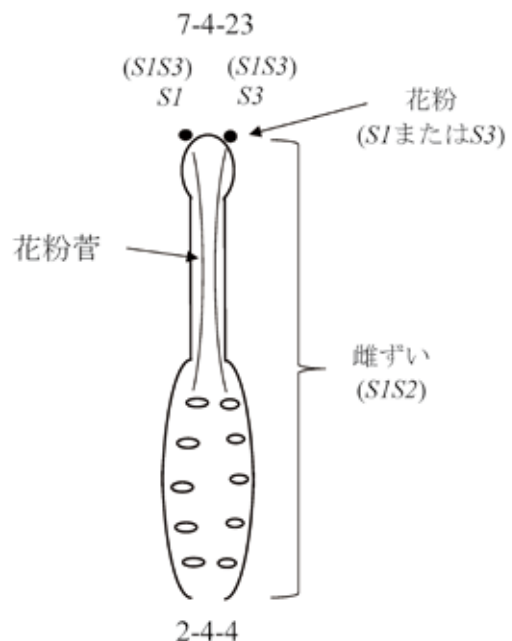


図4 パッションフルーツ自家和合性系統自家和合性系統2-4-4(母)と7-4-23(父)の遺伝子型模式図

交配親の推定遺伝子型をカッコ内で示した。2-4-4(母)および7-4-23(父)は自家和合性の系統であることから、S座に優劣性が存在すると推測される。F1における和合性の分離比(表1)から、両親は優性の自家和合性遺伝子S1をヘテロにもつ孢子体型不和合性と考えられる。

上のことから、今回供試した交配親はS座に優劣性が存在し、自家和合性遺伝子1つを持つヘテロ接合体の孢子体型自家不和合性であり、その遺伝子型は母本がS1S2、父本がS1S3であるということが推測された。

RAD-seq解析では、交配親とそのF1個体各4サンプルから6300万個以上のRADタグが得られ、平均するとサンプル当たり300万種類を超えるRADタグが、約8,200万個得られた。そして、F1の自家和合性バルクサンプルにのみ存在するRADタグが40万種類得られ、これらから、S1座と強く連鎖するDNAマーカーSC_{In/Del}を開発することができた。本試験で実施したRAD-seq解析規模は、Matsumura *et al.* (2014)が実施したニガウリの解析規模より大きく、Urasaki *et al.* (2015)が実施したパインアップルの解析規模よりも小さい。浦崎ら(2015)は、フローサイトメトリー法を用いてニガウリ、パインアップル、パッションフルーツ、トウガンそしてヘチマのゲノムサイズ比較を実施し、それぞれのゲノムサイズは、339Mb, 342Mbp, 1,708Mb, 926Mbそして1,251Mbと推定した。パッションフルーツのゲノムサイズがニガウリやパインアップルの約5倍大きいことを考慮すると、本研究で実施したパッションフルーツのRAD-seq解析規模は上記のニガウリ、パインアップルのRAD-seq解析と比較すると小さい。しかし、本報告ではゲノムサイズが大きいパッションフルーツでも、自家和合性のDNAマーカーが開発できた。RAD-seq解析など実験規模をどの程度実施すればよいか明確な指標は無く、今後、RAD-seq法を用いることで、ヘチマやトウガンのようなゲノムサイズが大きい沖縄特産農作物においても、有用形質のDNAマーカーの開発が可能であると推測される。

DNAマーカーSC_{In/Del}は、F1の自家和合性36個体中35個体、自家不和合性9個体中8個体の表現型を判別できた。判別できなかった2個体は、組み換え個体と推測される。供試した45個体中43個体において表現型が一致したことから、SC_{In/Del}と自家和合性遺伝子は強く連鎖していると考えられた。

DNAマーカーSC_{In/Del}の有効性を調べるため、農業研究センター名護支所で保存されている7種類の遺伝資源を用いてSC_{In/Del}による判定を実施した結果、正答率は100%であった。近年、SSRマーカー解析による品種識別結果から、農大紫1とサマークイーン、ハクホウとルビースターは同一であるとされており(未発表)、これらの自家和合および自家不和合性の判定結果は、品種識別結果と矛盾しない。SSRマーカー解析による品種識別結果を考慮すると、5種類の遺伝資源を用いたことになるが、

遺伝資源の中には海外から導入された品種・系統も含まれており、国内の品種だけでなく、海外の品種にもSC_{In/Del}マーカーが適用できた。今後、SC_{In/Del}は、これらの遺伝資源を用いた育種において広く利用できるDNAマーカーであると考えられる。

SC_{In/Del}の有用性を検証するため、本マーカーを他の育種集団に適用すると、DNAマーカーによって自家不和合性個体と判定された個体は、3組み合わせでそれぞれ20~25%であった。この分離比は期待値(3:1)とも合致する。その後、DNAマーカーで自家和合性と判定された個体を用いて温室にて栽培を行い、表現型を調査したところ正答率は93%以上と高い値を示した。以上のことから、SC_{In/Del}型を調べることで、育種集団からの自家和合性個体の選抜に本技術を活用できることが明らかとなった。本DNAマーカーを用いてパッションフルーツの実生集団の幼苗期に判定を行い、自家和合性個体のみを育苗する。その後、面積の限られるハウスに自家和合性かつ生育の良い個体を定植し、有用形質を持った個体のみを選抜することが可能になるため、今後のパッションフルーツ自家和合性品種育成の効率化が図られることが期待される。

謝 辞

本研究は「次世代沖縄ブランド作物特産化推進事業」により得られた成果である。関係者に感謝申し上げる。また、本研究の推進にあたり、沖縄県農業研究センター研究企画班バイオテクノロジーグループと名護支所果樹班の皆様には多大なご協力、ご助言をいただいた。心より感謝申し上げます。

引用文献

- Baird N.A., P.D. Etter, T.S. Atwood, M.C. Currey, A.L. Shiver, Z.A. Lewis, E.U. Selker, W.A. Cresk and E.A. Johnson (2008) Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS ONE*, 3:e3376.
- 藤本龍, 川辺隆大, 佐々木卓, 岡崎桂一 (2011) アブラナ科植物の雄性側の自家不和合性決定遺伝子の優劣性について, 新潟大学農学部研究報告, 64:17-26
- Madureira C. Herika, Telma N.S. Pereira, Maura Da Cunha, Denise E. Klein, Marcos V. V. de Oliveira, Leandro de Mattos and Goncalo A. de Souza Filho (2014), Self-incompatibility in passion fruit: cellular responses in incompatible pollinations. *Biologia*,69:574-584.
- Hiscock SJ and Tabah DA (2003) The different mechanisms of sporophytic self-incompatibility. *THE ROYAL SOCIETY*,

358:1037-1045.

- Ikeda K, Watari A, Ushijima K, Yamane H, Hauck N.R., Iezzoni A.F. and Tao R. (2004) Molecular markers for the self-compatible S⁴-haplotype, a pollen-part mutant in sweet cherry (*Prunus avinum* L.) . Journal of the American Society for Horticultural Science, 129:724-728.
- 松田昇, 長堂嘉孝, 島袋清香, 松村まさと (2005) ハウス栽培パッションフルーツの栽培技術開発, 第1報. 開花習性と結実習性, 沖縄農業, 39:5-17
- Matsumura H, Miyagi N, Taniai N, Fukushima M, Tarora K, Shudo A and Urasaki N (2014) Mapping of the gynoecey in bitter melon (*Momordica charantia*) using RAD-seq analysis. PLoS ONE, 9: e87138
- Okada K. (2015) DNA markers and the molecular mechanism of self- (in) compatibility in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) . The Horticulture Journal, 84:184-193.
- 沖縄県農林水産部 (2018) 沖縄の農林水産業, 25
- 沖縄農業会議 (2011) 熱帯果樹の栽培, 27-29
- Rêgo M. M., Bruckner C. H., Da Silva E. A. M., De Siqueira D. L., Fernandes A. A. and Finger F. L. (1999) Self-incompatibility in passion fruit: evidence of two locus genetic control. Theoretical and applied genetics, 98:564-508.
- Suassuna T. M. F., Bruckner C. H., Carvalho C. R. and Borem A. (2003) Self-incompatibility in passionfruit: evidence of gametophytic-sporophytic control. Theoretical and applied genetics, 106:298-302.
- Urasaki N, Goeku S, Kaneshima R, Takamine T, Tarora K, Takeuchi M, Moromizato C, Yonamine K, Hosaka F, Terakami S, Matsumura H, Yamamoto T and Shoda M (2015) Leaf margin phenotype-specific restriction-site-associated DNA-derived markers for pineapple (*Ananas comosus* L.) . Breeding science, 65:276-284.
- 浦崎直也, 太郎良和彦, 照屋和則, 赤嶺伸一, 與那嶺かおる, 谷合直樹, 玉城盛俊, 正田守幸, 関塚史朗 (2015) 沖縄県産作物7種のゲノムサイズ比較, 沖縄県農業研究センター研究報告, 9:47-50

Development of a self-compatibility-specific DNA marker for passion fruit (*Passiflora edulis*).

Ayaka Irei¹, Kazuhiko Tarora¹, Naotaka Ahagon², Masato Matsumura²,
Tetsuya Takushi², Moriyuki Shoda³, Satoshi Tamashiro⁴ and Naoya Urasaki¹

1 Okinawa Prefectural Agricultural Research Center

2 Okinawa Prefectural Agricultural Research Center Nago Branch

3 Okinawa Prefectural Agriculture, Forestry and Fisheries General Administration Division

4 Okinawa Prefectural Chubu Agricultural Development Center

Abstract

To develop self-compatibility (SC) -specific DNA markers for passion fruit, we obtained F1 progeny by crossing an SC line '2-4-4' (female) and '7-4-23' (male) . From the segregation ratio of individuals showing SC and self-incompatibility (SI) in the F1 progeny, SI in passion fruit used was considered to be sporophytic. Restriction-site-associated DNA sequencing (RAD-seq) analysis was employed to analyze 2-4-4, 7-4-23, and bulked DNA of SC and SI F1 progeny. From the analysis, more than 63 million RAD tags were obtained from the parents and two bulked DNA samples. In the RAD-tags, over 0.4 million SC-specific unique RAD tags were detected. An SC-specific RAD-tag, SC22360, was successfully converted to a DNA marker, designated as *SC_In/Del*, with a difference in PCR-products lengths between alleles. From the genotyping of F1 progeny with *SC_In/Del*, an association between SC and *SC_In/Del* was observed. Furthermore, to confirm the availability of *SC_In/Del*, genotyping of seven genetic resources and three other F1 progeny was carried out. In the seven genetic resources, *SC_In/Del* perfectly identified their phenotype, SC or SI. In the three F1 progeny, 286 of 364 seedlings were estimated as SC from their *SC_In/Del* genotype, and 209 of 286 seedlings estimated as SC were planted in a greenhouse. According to phenotyping in the greenhouse, 93% of the 209 plants showed SC. From these results, *SC_In/Del* developed in this study was considered to be applicable for the marker-assisted selection of SC plants in passion fruit breeding.

Keywords: RAD-seq, self-incompatibility, sporophytic self-incompatibility

原著論文

ヒハツモドキの挿し木増殖に適した培地の選定

大野 豪^{1*}, 根本明子², 玉城盛俊³

1 沖縄県農業研究センター石垣支所 (* 現所属: 沖縄県病害虫防除技術センター)

2 琉球産経株式会社

3 沖縄県農業研究センター

要 約

沖縄において古くから香辛料・薬用植物として利用され、近年では機能性食材としても注目されているヒハツモドキの挿し木による増殖法確立に向け、本種よじのぼり茎とほふく茎を種々の成形・非成形培地に挿し、その後の発根を調べた。その結果、これまでに発根が良好なことが知られていた育苗用のフェノール樹脂発泡体(オアシス[®])以外にも、生け花用のフェノール樹脂発泡体の軟らかいタイプ2種(アクアフォーム[®]のソフトとスタンダード)、ロックウール(グロダン[®])、赤玉土、鹿沼土、河川砂およびパーミキュライトで双方のタイプの茎ともよく発根することが判明した。したがって、現時点ではこれらの培地がヒハツモドキの挿し木用として推奨できる。生け花用フェノール樹脂発泡体の硬いタイプ2種(アクアフォーム[®]ハードおよびメーカー不明の1種)、固化培土(プラントプラグ[®])、水稻育苗用培土(くみあい培土)およびミズゴケの5種培地は、よじのぼり茎を用いた場合では発根がよかつたものの、ほふく茎の発根が優れなかったため、よじのぼり茎だけに使用可能である。ピートモスは双方のタイプの茎の発根が悪く、本種の挿し木培地としては適さない。

キーワード: コショウ科, ピパーズ, 育苗, 琉球列島, 八重山。

緒 言

ヒハツモドキ *Piper retrofractum* Vahl (コショウ科) は、インドネシアやマレーシア、タイ等の東南アジア地域原産とされるつる植物であり、これらの地域を中心に、世界各地で香辛料や生薬として用いられている (Weiss, 2002; Lim, 2012)。日本においても、沖縄県、特にその南西端に位置する八重山地域では、本種は住居の周囲にしばしば植栽されており、ピパーズ、ピーヤシ等の方言名で呼ばれ、その果穂や葉は香りがよいため、古くから香辛料等に用いられてきた (多和田, 1981; 山門, 1996)。本種は他のコショウ科植物と同様に、その果穂や葉等に piperine 等の各種機能性成分を含むことから (たとえば, Luyen et al. (2014)), 最近では伝統食材としてだけではなく、健康食品としても注目されるようになってきている。このため近年沖縄においては、本種の果穂等の収量・品質の向上のための栽培技術開発に対する要望が高まりつつあり (大野ら, 2016)、また収穫物の品質向上のための加工技術の研究も始められている (Takahashi et al., 2017)。こうした技術開発のための研究や、それらの成果の普及を今後進めるためには、苗の増殖が不可欠であるが、そのための研究事例は近年までほとんどなかった (Evizal, 2013)。しかし、最近になって大野ら (2018) は、ヒハツモドキの挿し木による増殖法確立に向け、市販の挿し木

用発泡成形培地(オアシス[®])を用いて挿し木に適する植物体の特性(挿し穂として使用すべき部位や節数等)を検討し、適切な部位を選びさえすれば、冬期を除いて7割以上の挿し穂を安定的に発根させられることを示した。一方で、本種の挿し木による増殖法の効率化や低コスト化のためには、挿し穂となる植物体の特性だけでなく、発根に適した環境条件を特定することが重要となる。そこで本研究では、こうした環境条件特定のための試験の一環として、ヒハツモドキの発根に適した挿し木培地を選別するため、オアシス[®]を含む種々の成形・非成形培地を用いて発根を調べた。

材料および方法

試験環境および供試材料

沖縄県農業研究センター石垣支所(石垣市平得地底原)のガラス室において、2014年4月から2015年12月にかけて試験した。ガラス室内では遮光のため、2 mm 目合いの黒色ナイロンネットを、挿し穂の供給元となる親株の保管場所には1枚、挿し木後のセルトレイの保管場所には2枚重ねて、いずれも地上高約2 mの位置に展開した (Fig. 1)。挿し木後のセルトレイ (54 cm × 28 cm; セル数は以下参照) は水稻用育苗箱 (61 cm × 30 cm) に入れ、高さ



Fig. 1. Experimental environment and examples of plug trays in which cuttings of *Piper retrofractum* were applied in a glass greenhouse at Ishigaki Branch, Okinawa Prefectural Agricultural Research Center.

65 cm の台の上に静置した (Fig. 1). ガラス室の側窓は、その総面積の3分の1相当を、台風襲来時を除いて常に網戸の状態で開催したが、挿し木後のセルトレイを置いていた一角 (5.5 m × 3.5 m) の側窓だけは、風よけのために常時閉め切った。この一角の遮光ネットの下 (高さ 1.6 m 前後) には散水ノズル 9 個をおおむね等間隔で吊り下げ (Fig. 1), 試験期間中毎日、午前 9 時頃より 10 分間散水を行った。灌水ムラ等の環境条件の違いが試験結果に影響しないように、週 2 ~ 3 回セルトレイの配置を入れ替えた。

ヒハツモドキは、他の多くのコショウ科植物の種で見られるように (たとえば, Chaveerach *et al.* (2006)), よじのぼり茎 (climbing stem) とほふく茎 (creeping stem) という、葉の形状等の外観が異なる茎を発生させる (Fig. 2; 詳細については大野ら (2018) を参照)。これらの茎はいずれも挿し穂として利用可能であるため (大野ら, 2018), 本研究においても双方を供試した。よじのぼり茎の供給源となる親株としては、大野ら (2016) が八重山地域の島々 (石垣島, 竹富島, 黒島, 小浜島, 西表島, 波照間島) からよじのぼり茎を採取し育成した株を、産地の区別なしに用い、ほふく茎の親株としては、大野ら (2018) が発根後の初期生育比較に用いた株のうち、ほふく茎由来のもの (すべて石垣島産) を用いた (栽培管理法については、それぞれの文献に記載されているので、そちらを参照されたい)。大野ら (2018) のオアシス® を用いた試験では、茎先端部は発根が劣る場合がみられたため、本研究では茎先端の 2 節は切除し、3 節目から 12 節目程度まで

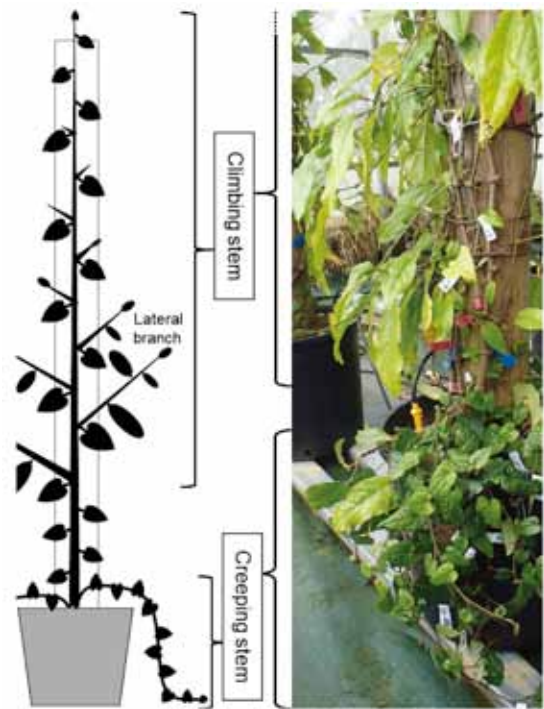


Fig. 2. Schematic and photographic representations of the climbing and creeping stems of *Piper retrofractum*.

の中間部のみを挿し穂に用いた。また大野ら (2018) では、挿し穂によじのぼり茎を用いる場合は 3 ~ 4 節、ほふく茎を用いる場合は 2 ~ 3 節が適するとされたため、本研究もそれに従った。大野ら (2018) と同様に、試験用の挿し穂はいずれの場合も月齢 6 ヶ月以内の茎から切り出し、挿ししろとして最下位節より下を 2.5cm 前後 (これに満たない場合はできるだけ長く) 残し、よじのぼり茎に側枝 (lateral branch; Fig. 2 を参照) がある場合はこれを切除し、切り出した挿し穂はすみやかに水に浸漬して 6 時間以内に挿し木した。

なお本研究では、供試可能な挿し穂の数や作業人員等の制約により、供試培地全種と 2 種の茎を同時に用いて発根比較を行うことが困難であったため、以下のように、培地のタイプ (成形培地と非成形培地) と茎の種類 (よじのぼり茎とほふく茎) の組み合わせが互いに異なる 4 つの試験に分け、それらを 2014 年から 2015 年にかけての異なる期間に (それぞれの試験は春 ~ 夏期と秋 ~ 冬期の 2 回) 実施した。

試験 1. 異なる成形培地間でのよじのぼり茎の発根比較

挿し木培地には、Table 1 に示した 8 種の成形培地 (育苗用フェノール樹脂発泡体 2 種, 生け花用フェノール樹脂発泡体 4 種, ロックウール 1 種, 固化培土 1 種) を供試した。育苗用フェノール樹脂発泡体としては、Oasis® Grower Solutions 社のオアシス® さし

Table 1. List of rooting media tested in the present study

Type of medium: Commercial or Japanese name	Abbreviation	Manufacturer	Other notes
Artificially-formed medium			
Phenolic resin foam for plant propagation:			
Oasis® Rootcubes® P1	OP	Oasis® Grower Solutions	Gas and liquid phases approx. 33% and 65%
Oasis® Horticultubes® H1	OH	<i>ditto</i>	Gas and liquid phases approx. 65% and 33%
Phenolic resin foam for flower arrangement:			
Aquafoam® Soft	AFS	Matsumura Aqua Co., Ltd.	
Aquafoam® Standard	AF	<i>ditto</i>	
Aquafoam® Hard	AFH	<i>ditto</i>	
Green Foam	GF	Unknown	Harder than Aquafoam® Hard
Rockwool: Grodan® 1" A-OK Starter Plugs	GR	Rockwool B. V.	
Formed soil: Plant Plug® 128	PP	Sakata Seed Corporation	Mixture of peat moss, coconut fiber and others
Non-formed medium			
Akadama soil: 平和赤玉土 (小粒)	AS	Tachikawa Heiwa Nouen Co., Ltd.	
Kanuma pumice: 平和鹿沼土	KP	<i>ditto</i>	
River sand: 河川砂	RS	Nakano Kousan (Itoman City)	
Rice nursery soil: くみあい培土	RN	JA Okinawa	
Sphagnum moss: Spagmoss™ Premier	SM	Besgrow	New Zealand sphagnum moss
Peat moss: Morning Glory	PM	Theriat & Hachey Peat Moss Ltd.	Canadian sphagnum peat moss
Vermiculite: パーミキュライト3号	VM	Ryukyu Sankei Co., Ltd.	

木育苗用 (Oasis® Rootcubes® P1, 気相約 33%・液相約 65%, 品番 5710, 以下 OP と略; Fig. 3A) とオアシス® 播種育苗・水耕用 (Oasis® Horticultubes® H1, 気相約 65%・液相約 33%, 品番 5810, OH と略) を用いた. OP は大野ら (2018) が用いたもの (品番 5615) と形状は異なるが同一素材であり, OH とは気相・水相の比率が異なる (さらなる詳細は, 国内の取扱会社である (株) ニッソーグリーンのホームページ http://www.ns-green.com/pd/007_02.html 等を参照). 生け花用フェノール樹脂発泡体としては, 松村アクア (株) の互いに硬さが異なる 3 種, すなわちアクアフォーム®・ソフト (AFS と略), アクアフォーム®・スタンダード (AF と略) およびアクアフォーム®・ハード (AFH と略), ならびにメーカー不明の Green Foam (メイクマン石垣店で購入, GF と略; Fig. 3B) を用いた (GF は, 3 種のアクアフォーム®の中で最も硬い AFH よりも明らかに硬い). これらフェノール樹脂発泡体はいずれも, まず 2.5cm × 2.5cm × 4cm 程度の立方体に切り分け, さらに 128 穴セルトレイの各セルに入るよう, カッターナイフを用いて下面が 1.5cm × 1.5cm 程度のくさび型 (Fig. 3A, B) に整形した. ロックウールは Rockwool B. V. 社の Grodan® 1" A-OK Starter Plugs (GR と略) であり, これは 128 穴セルトレイに入れやすい形に成形されているが, 個々のピースはつながっているため (Fig. 3C), ハサミで切り分けてから用いた. 固化培土は (株) サカタのタネのプラントプラグ® (128 穴, PP と略) であり, これはココヤシ繊維やピートモス, 固形剤等の混合物が 128 穴セルトレイに充填された状態で供給されているため (Fig. 3D), 元のセルト

レイから取り出してから用いた.

以上 8 種の成形培地を, 128 穴セルトレイに無作為順で 1 穴おきに入れ, 水道水で十分湿らせてから, これらの培地に, 3 節に切り分けたよじのぼり茎 (全節に葉を有するもの) を 1 本ずつ, 最下位節が培地表面に触れるかやや埋まる程度まで挿した. 1 穴おきに培地を入れたのは, 隣接する挿し穂の最下位節の葉が培地表面を覆うことにより, 灌水ムラが生じるのを防ぐためである. なお, OP, OH, GR および PP には挿し穴が開けられているため (Fig. 3 を参照), 原則としてこの穴に挿したが, 挿し穂が細いために穴に挿すと固定されにくい場合は, 穴から 5mm ほど離れた位置に挿した. 挿し木後のトレイは上述のガラス室内に保管し, 35 日後に挿し穂を培地から取り出し, 肉眼で発根の有無を確認した. 発根が認められたものについては, 根の伸長程度の指標として, 最大根長 (最も長い根の長さ) を 1 mm 単位で測定した. この試験は 2014 年 4 ~ 5 月と同年 11 ~ 12 月に実施した. 用いた挿し穂の平均長 (最上位節と最下位節間の距離, 以下同様) は, 1 回目の試験で 12.1cm, 2 回目の試験で 12.8cm であった (Table 2 には処理区ごとの平均長も示した).

試験 2. 異なる成形培地間でのほふく茎の発根比較

試験 1 と同じ 8 種の培地を準備し, これらを 128 穴セルトレイの全穴に無作為順に入れて十分に湿らせ, 2 節に切り分けたほふく茎 (両節に葉を有するもの) を 1 本ずつ挿し木した. ほふく茎の葉はよじりぼり茎のものより小さく, 隣接する培地表面を覆ってしまうことは少ないため, 全穴に入れた培地に挿



Fig. 3. Examples of rooting media tested in the present study. A-D, artificially-formed media put in 128-cell plug trays [A, phenolic resin foam for plant propagation (Oasis® Rootcubes® P1) ; B, phenolic resin foam for flower arrangement (Green Foam) ; C, rockwool (Grodan® 1" A-OK Starter Plugs) ; D, formed soil (Plant Plug® 128)]. E-K, non-formed media put in single cells of 72-cell plug trays [E, Akadama soil; F, Kanuma pumice; G, river sand; H, rice nursery soil (Kumiai Baido) ; I, sphagnum moss; J, peat moss; K, vermiculite]. L, an example of 72-cell plug tray in which several media were put in a randomized order. See Table 1 for further information on the rooting media.

し木しても問題ない。挿し方および以降の取り扱いについては試験1と同じである。本試験は2014年11～12月と2015年4～5月に実施した。挿し穂の平均長は、1回目の試験で6.3cm、2回目の試験で5.8cmであった（Table 3には処理区ごとの平均長も示した）。

試験3. 異なる非成形培地間でのよじのぼり茎の発根比較

挿し木培地には、Table 1に示した7種の非成形培地、すなわち、赤玉土（平和赤玉土（小粒）、（株）刀川平和農園；Fig. 1E）、鹿沼土（平和鹿沼土、（株）刀川平和農園；Fig. 3F）、河川砂（中野興産（糸満市）；Fig. 3G）、水稻育苗用培土（くみあい培土、JAおきなわ；Fig. 3H）、ニュージーランド産ミズゴケ

(Spagmoss™ Premier, Besgrow 社 ; Fig. 3I), カナダ産ピートモス (Morning Glory, Theriault & Hachey Peat Moss 社 ; Fig. 3J) およびパーミキュライト (パーミキュライト 3号, 琉球産経 (株) ; Fig. 3K) を供試した. さらに比較のため, 試験 1・2 で発根成績のよかった成形培地のひとつである OP (結果を参照) と同一素材であるが形状が異なる培地 (同一メーカー, 品番 5770) を, 3cm × 3cm × 5cm 程度の立方体に切り分けたもの (Fig. 3L を参照 ; 簡単のため, 以下ではこれも OP と呼ぶ) も本試験に含めた. これら合計 8 種の培地を水道水で十分に湿らせたのち, 72 穴セルトレイの全穴に無作為順で表面が盛り上がらない程度に入れた (Fig. 3L). これらの培地に, 4 節に切り分けたよじのぼり茎 (少なくとも上位 3 節に葉を有するもの) を 1 本ずつ, 最下位節に葉がある場合はこれを切除したのち, 最下位節が培地表面から約 1cm の深さに埋まるように挿した. この時, ミズゴケだけは手で挿し穂を押し込むのが困難な場合が多かったため, 前もって竹ひごを挿入して挿し穴を確

保してから挿した. 以降の挿し穂の取り扱いについては試験 1 と同じである. 本試験は 2015 年 5 ~ 6 月と同年 10 ~ 12 月に実施した. 挿し穂の平均長は, 1 回目の試験で 17.4cm, 2 回目の試験で 21.8cm であった (Table 4 には処理区ごとの平均長も示した).

試験 4. 異なる非成形培地間でのほふく茎の発根比較

試験 3 と同様に 8 種培地を入れた 72 穴セルトレイを準備し, 3 節に切り分けたほふく茎 (少なくとも上位 2 節に葉を有するもの) を 1 本ずつ, 最下位節に葉がある場合はこれを切除したのち, 最下位節が培地表面から約 1cm の深さに埋まるように挿した. 挿し方および以降の取り扱いについては試験 3 と同じである. 本試験は 2015 年 4 ~ 5 月と同年 10 ~ 12 月に実施した. 挿し穂の平均長は, 1 回目の試験で 5.2cm, 2 回目の試験で 8.1cm であった (Table 5 には処理区ごとの平均長も示した).

Table 2. Comparison of rooting characteristics of climbing stems of *Piper retrofractum* among varying artificially-formed rooting media

Experiment No. (period ^a)/ rooting medium tested ^b	N	Cutting length (cm) ^c	% rooting ^d	Maximum root length (cm) ^e
Exp. 1 (14 Apr.-19 May, 2014)				
OP	56	12.4 ± 0.25	89.3 a	2.28 ± 0.18 ab
OH	56	12.3 ± 0.25	89.3 a	1.88 ± 0.16 a
AFS	56	11.6 ± 0.28	80.4 a	1.70 ± 0.15 a
AF	56	12.0 ± 0.25	80.4 a	2.18 ± 0.17 a
AFH	56	12.2 ± 0.27	92.9 a	1.83 ± 0.14 a
GF	56	12.1 ± 0.23	75.0 a	1.72 ± 0.18 a
GR	56	12.3 ± 0.24	89.3 a	2.40 ± 0.20 ab
PP	56	12.0 ± 0.25	82.1 a	2.99 ± 0.25 b
Exp. 2 (14 Nov.-19 Dec., 2014)				
OP	56	12.4 ± 0.28	82.1 a	1.12 ± 0.07 a
OH	56	12.9 ± 0.27	82.1 a	1.02 ± 0.07 a
AFS	56	13.1 ± 0.26	76.8 a	1.01 ± 0.09 a
AF	56	13.0 ± 0.25	73.2 a	0.89 ± 0.08 a
AFH	56	12.8 ± 0.30	75.0 a	0.92 ± 0.09 a
GF	56	12.9 ± 0.30	67.9 a	0.94 ± 0.10 a
GR	56	13.0 ± 0.30	83.9 a	0.99 ± 0.07 a
PP	56	12.6 ± 0.29	66.1 a	1.72 ± 0.16 b

^a: 35 days from the date of insertion of cuttings into the media to the date of inspection of rooting. ^b: See Table 1 for abbreviations. ^c: Mean ± SE of the linear distance between the uppermost (first) and the undermost (third) nodes of the cutting at the start of the experiment. ^d: Percentage of cuttings each bearing at least one newly emerged root. Values with the same letter are not significantly different (Fisher's exact tests followed by FDR adjustment, $P = 0.05$). ^e: Mean ± SE of the length of the longest root among the newly emerged roots. Values with the same letter are not significantly different (Tukey-Kramer HSD test, $P = 0.05$).

データ解析

以上のすべての試験において、発根率と最大根長を異なる培地間で多重比較した。発根率（発根が認められた挿し穂の割合）については、Fisherの正確確率検定によって2種培地間での総当たりの比較を行ったのち、FDR (false discovery rate) 法 (Benjamini and Hochberg, 1995) によって5%水準で有意差がある組み合わせを選び出した。最大根長についてはTukey-KramerのHSD検定によって多重比較した。

結果

1. 成形培地—よじのぼり茎 (Table 2)

2回の試験とも、培地間に発根率の有意差はみられず、いずれの培地においてもその値は7割かそれ以上と高かった。最大根長については、1回目（春期）の試験ではPPがOH, AFS, AF, AFHおよびGFよりも有意に長く、OPとGRがそれらの中間の値を示し、他のいずれの培地とも有意に異ならないという結果になった。2回目（秋～冬期）の試験では、PPが他の7培地よりも有意に長く、7培地間には有意差はみられなかった。

2. 成形培地—ほふく茎 (Table 3)

1回目（秋～冬期）の試験では、培地間に発根率の有意差はみられず、いずれの培地においても6割未満と全体的に低かった。最大根長については、PPがGR以外の6培地より有意に長く、GRの値はそれらの中間であり、いずれの培地とも有意に異ならなかった。2回目（春期）の試験では、発根率はOP, OHおよびGRで9割前後と高く、AFHが6割強、GFとPPが3割未満であり、これら3群の間に有意差がみられた。AFSとAFの発根率は7割強であり、OP他2培地およびAFHのどちらとも有意に異ならなかった。最大根長については、GFがOPとGRより有意に短く、他の5培地の値はそれらの中間であり、いずれの培地とも有意に異ならなかった。

3. 非成形培地—よじのぼり茎 (Table 4)

1回目（春～夏期）の試験では、7つの培地で発根率が8割以上と高かったが、ピートモス (PM) の発根率だけが1割未満と低く、他の培地と有意に異なった。最大根長についてもPMが最も短く、OP, 河川砂 (RS), バーミキュライト (VM) 以外の他4培地との間に有意差がみられた。2回目（秋～冬期）の試験では、PMの発根率が7割で最も低く、

Table 3. Comparison of rooting characteristics of creeping stems of *Piper retrofractum* among varying artificially-formed rooting media

Experiment No. (period ^a)/ rooting medium tested ^b	N	Cutting length (cm) ^c	% rooting ^a	Maximum root length (cm) ^a
Exp. 1 (21 Nov.-26 Dec., 2014)				
OP	41	6.17 ± 0.28	41.5 a	0.66 ± 0.24 a
OH	40	6.20 ± 0.24	37.5 a	0.53 ± 0.08 a
AFS	42	6.43 ± 0.23	40.5 a	0.58 ± 0.13 a
AF	43	5.98 ± 0.24	39.5 a	0.83 ± 0.21 a
AFH	41	6.29 ± 0.19	29.3 a	0.59 ± 0.15 a
GF	40	6.33 ± 0.27	60.0 a	0.90 ± 0.21 a
GR	42	6.45 ± 0.29	33.3 a	1.14 ± 0.23 ab
PP	40	6.33 ± 0.27	35.0 a	1.96 ± 0.30 b
Exp. 2 (22 Apr.-27 May, 2015)				
OP	48	5.83 ± 0.27	91.7 c	4.28 ± 0.35 b
OH	48	5.65 ± 0.26	91.7 c	4.04 ± 0.29 ab
AFS	48	5.48 ± 0.29	77.1 bc	2.60 ± 0.36 ab
AF	48	6.19 ± 0.29	72.9 bc	3.13 ± 0.35 ab
AFH	48	6.00 ± 0.30	64.6 b	2.79 ± 0.35 ab
GF	48	5.50 ± 0.28	22.9 a	2.15 ± 0.68 a
GR	48	5.98 ± 0.28	87.5 c	4.46 ± 0.35 b
PP	48	5.75 ± 0.27	29.2 a	3.04 ± 0.78 ab

^a: See footnotes of Table 2 for explanations. ^b: See Table 1 for abbreviations. ^c: Mean ± SE of the linear distance between the uppermost (first) and the undermost (second) nodes of the cutting at the start of the experiment.

鹿沼土 (KP) と VM の発根率 (いずれも 100%) と有意に異なり, 残りの 5 培地の発根率は 9 割前後で他のどの培地とも有意に異ならなかった. 最大根長については OP が最も短く, PM と VM を除く 5 培地と有意に異なり, 一方で赤玉土 (AS), 水稻育苗用培土 (RN) およびミズゴケ (SM) では, KP を除いた 4 培地よりも有意に長かった.

4. 非成形培地—ほふく茎 (Table 5)

2 回の試験とも, PM の発根率が 0 ~ 3 割と最も低く, 他の 7 培地と有意に異なった. PM を除くと, 1 回目 (春~夏期) の試験では OP, AS および RS の発根率 (9 割以上) が RN および SM の発根率 (7 割弱) より有意に高く (残りの 2 培地はそれらの中間), 2 回目 (秋~冬期間) では培地間に発根率の有意差はみられなかった. 最大根長については, 1 回目の試験では RS が最も短く (PM は発根がみられなかったため比較できず), AS, KP および RN と有意に異なり, 残りの 3 培地はそれらの中間の値を示した. 2 回目の試験では, PM の最大根長が最も短く, 他の 7 培地と有意に異なり, 一方で RN の最大根長は最も長く, AS と KP を除く 5 培地と有意に

異なった. 残りの 4 培地の最大根長はそれらの中間であり, その中では SM と VM の値が RS よりも有意に大きく, OP の値はそれら双方と有意に異ならなかった.

考 察

本研究は, ヒハツモドキの挿し木増殖に適した培地を選定するため, 本種によじのぼり茎およびほふく茎を挿し穂として用い, 種々の成形・非成形培地での発根を調べた. その結果, これまでに発根が良好なことが知られていたオアシス® 以外にも, 複数種の培地で良好な発根がみられることを明らかにし, ヒハツモドキの増殖や今後の栽培技術開発にとって重要となる知見を得た. 具体的には, 成形培地では固さが互いに異なる生け花用フェノール樹脂発泡体 4 種のうち軟らかいほうの 2 種 (AFS・AF) とロックウール (GR) が, 非成形培地では赤玉土 (AD), 鹿沼土 (KP), 河川砂 (RS) とバーミキュライト (VM) が, よじのぼり茎とほふく茎のどちらを挿し穂に用いた場合でも, オアシス® と発根や

Table 4. Comparison of rooting characteristics of climbing stems of *Piper retrofractum* among varying non-formed rooting media

Experiment No. (period ^a)/ rooting medium tested ^b	N	Cutting length (cm) ^c	% rooting ^a	Maximum root length (cm) ^a
Exp. 1 (20 May-24 Jun., 2015)				
OP	36	17.8 ± 0.55	100.0 b	3.06 ± 0.22 ab
AS	36	17.4 ± 0.57	94.4 b	4.40 ± 0.17 cd
KP	36	17.2 ± 0.52	91.7 b	3.50 ± 0.15 bc
RS	36	17.7 ± 0.54	100.0 b	2.56 ± 0.12 ab
RN	36	16.9 ± 0.45	91.7 b	5.33 ± 0.22 d
SM	36	17.9 ± 0.54	83.3 b	4.63 ± 0.28 cd
PM	36	17.2 ± 0.53	8.3 a	2.00 ± 0.60 a
VM	36	17.5 ± 0.18	91.7 b	3.04 ± 0.16 ab
Exp. 2 (29 Oct.-3 Dec., 2015)				
OP	36	22.1 ± 0.43	97.2 ab	1.85 ± 0.12 a
AS	36	22.4 ± 0.50	94.4 ab	3.63 ± 0.17 c
KP	36	22.0 ± 0.55	100.0 b	3.21 ± 0.22 bc
RS	36	21.9 ± 0.49	97.2 ab	2.02 ± 0.14 a
RN	35	22.1 ± 0.51	88.6 ab	3.54 ± 0.24 c
SM	35	21.3 ± 0.49	88.6 ab	3.43 ± 0.16 c
PM	36	20.8 ± 0.55	72.2 a	2.49 ± 0.25 ab
VM	36	21.5 ± 0.50	100.0 b	2.62 ± 0.14 ab

^a: See footnotes of Table 2 for explanations. b: See Table 1 for abbreviations. OP is not a non-formed medium but included for comparison. c: Mean ± SE of the linear distance between the uppermost (first) and the undermost (fourth) nodes of the cutting at the start of the experiment.

その後の根の伸長程度が同等である（場合によっては勝る）ことが判明した（Tables 2-5）。したがって、現時点ではこれらの培地がヒハツモドキの挿し木用として推奨できる。

以上の培地は、ヒハツモドキの発根においては同等に優れると考えられる一方で、扱いやすさや価格に違いがある。たとえば、非成形培地を使用する場合、挿し穂を固定するために、少なくとも最下位節を培地中に埋め込む必要があるが、成形培地では、挿し穂の最下位節が培地表面に触れるかやや埋まる程度まで挿せば十分に固定されるため（筆者らの経験による）、この点で挿す時の手間が少なく済む。また、非成形培地に挿した挿し穂は、手や体の一部が触れた場合に動きやすいため、挿した後の取り扱い（トレイの移動など）にある程度の慎重さが必要とされるが、成形培地に挿した挿し穂は非成形培地に挿したものと比べると動きにくいいため、挿し木後の取り扱いが容易である。一方、成形培地は非成形培地と比べて単価が高く、128穴セルトレイの1セル相当の価格は前者で3～5円程度であるのに対し、後者では1円未満である。したがって、実際に育苗を行う場面では、投入可能な予算や人員に応じて使

用する培地を選ぶのがよいであろう。

今回、オアシス[®]には気相と液相の比率がおおむね1:2または2:1で固相の比率は同一である2種(OP・OH)を用いたが、これらの培地間で発根率や最大根長に有意差はみられなかったため、この程度の気相・液相の違いは、今回の育苗条件では発根に影響しなかったと考えられる。一方で、今回の試験では培地の乾燥を防ぐために毎日灌水したが、より灌水頻度が低い条件下では、これら2種のオアシス[®]や、さらには上記の他の培地も含めた培地間に、発根やその後の根の伸長に違いがみられる可能性も残る。灌水回数が少なく済む培地のほうがより利用価値が高いと考えられるため、今後は今回発根成績がよかった培地から、さらに好適な培地を絞り込むための実験をする必要があるだろう。

生け花用フェノール樹脂発泡体4種のうち硬いほうの2種(AFH・GF)、固化培土(PP)、水稻育苗用培土(RN)およびミズゴケ(SM)の5種培地は、よじのぼり茎を用いた場合では発根やその後の根の伸長がオアシス[®]と同等であった（場合によっては優れた）(Tables 2, 4)ものの、ほふく茎を用いた場合には、発根率と最大根長のいずれかまたは両方が

Table 5. Comparison of rooting characteristics of creeping stems of *Piper retrofractum* among varying non-formed rooting media

Experiment No. (period ^a)/ rooting medium tested ^b	N	Cutting length (cm) ^c	% rooting ^a	Maximum root length (cm) ^a
Exp. 1 (30 Apr.-4 Jun, 2015)				
OP	35	5.17 ± 0.34	94.3 d	5.98 ± 0.41 ab
AS	36	5.36 ± 0.32	91.7 d	7.68 ± 0.43 c
KP	35	4.86 ± 0.32	88.6 bcd	6.79 ± 0.40 bc
RS	36	4.78 ± 0.29	91.7 d	4.75 ± 0.28 a
RN	35	5.89 ± 0.36	65.7 b	6.82 ± 0.38 bc
SM	35	5.06 ± 0.33	68.6 bc	5.33 ± 0.52 ab
PM	35	5.69 ± 0.35	0.0 a	—
VM	35	4.83 ± 0.26	91.4 cd	5.65 ± 0.24 ab
Exp. 2 (27 Oct.-1 Dec., 2015)				
OP	36	8.22 ± 0.25	100.0 b	4.99 ± 0.26 bc
AS	36	7.89 ± 0.25	100.0 b	6.18 ± 0.22 cd
KP	36	8.33 ± 0.25	97.2 b	6.35 ± 0.34 cd
RS	36	7.97 ± 0.21	100.0 b	3.62 ± 0.21 b
RN	36	8.47 ± 0.32	97.2 b	7.09 ± 0.35 d
SM	36	7.86 ± 0.22	83.3 b	5.38 ± 0.47 c
PM	36	7.75 ± 0.19	33.3 a	1.68 ± 0.26 a
VM	35	8.20 ± 0.25	100.0 b	5.61 ± 0.21 c

^a: See footnotes of Table 2 for explanations. ^b: See Table 1 for abbreviations. OP is not a non-formed medium but included for comparison. ^c: Mean ± SE of the linear distance between the uppermost (first) and the undermost (third) nodes of the cutting at the start of the experiment.

オアシス[®]に劣る場合があった (Tables 3, 5). この事実は、増殖によじのぼり茎を用いる場合にはこれらの培地も使用可能であることを示すとともに、よじのぼり茎とほふく茎の間で、発根可能な環境条件の幅に違いがある (前者のほうがより幅が広い) ことを強く示唆する. このような差異を生み出す原因は現時点では不明であるが、この点を明らかにすることは生物学的に興味深いだけでなく、本種の栽培技術開発にも有用となる知見をもたらすため、今後追求する価値がある. これら5種培地には、ほふく茎の発根や根の伸長に悪影響を及ぼす共通要因があるかもしれない、まずはその点を検討することが、この現象の原因究明につながる可能性がある.

今回供試した培地の中で、ピートモス (PM) だけは、よじのぼり茎とほふく茎の双方において発根率が1割未満と顕著に低い場合があり (Tables 4, 5), 本種の挿し木培地としては最も適していないと言える. ピートモスが挿し木培地に適さない植物種があることは、古くから知られている (Hitchcock, 1928; Chadwick, 1933). Hitchcock (1928) は、多種の植物をピートモスと砂に挿し木して発根を調べ、ピートモスで容易に発根するが砂ではしない植物 (グループ I), 砂では容易に発根するがピートモスではしない植物 (グループ II) および双方の培地で容易に発根する植物 (グループ III) に類別した. 本研究の結果は、ヒハツモドキがグループ II に属することを明確に示している. Hitchcock (1928) はさらに、いくつかの植物種を用いた実験結果に基づき、異なる培地間での発根の違いには培地の pH が影響を及ぼしている (ただし、それが単一の制限要因ではない) と述べた. Hitchcock (1928) は、グループ II の植物の挿し穂に悪影響を与える pH の臨界値は 3.6 から 4.1 の間の狭い範囲にあるとも述べている. ヒハツモドキにおいても、ピートモスの発根成績が悪い原因のひとつがその低い pH にある可能性はあるだろう. 本研究では、ピートモスを挿し木培地に用いた場合、春～夏期と秋～冬期の双方において、よじのぼり茎のほうがほふく茎よりも発根がよく (Tables 4, 5), またピートモスが原料のひとつとして用いられている PP を用いた場合にも同じ傾向がみられた (Tables 1, 3). これらの結果は、よじのぼり茎とほふく茎の pH への反応性の違いを反映したものである可能性もある. さらに本研究では、よじのぼり茎とほふく茎の双方において、春～夏期のピートモスでの発根率 (1割未満) が秋～冬期のそれ (3割以上) より明らかに低かった (Tables 4, 5). このような時期間での発根の違いには、気温等の環境条件や、用いた挿し穂の生理的状態 (少なくとも長さは異なっていた) が影響した可能性があるが、時期間での培地 pH のわずかなゆらぎが影響した可能性もある. 今

回観察されたような、茎のタイプ間や時期間での発根の違いの原因究明は、より安定的に発根させる技術の開発に結びつくことが期待されるため、その原因の1候補としての培地 pH と、ヒハツモドキの発根との詳細な関係を今後明らかにする必要がある.

謝 辞

試験準備や育苗施設の管理等の作業を手伝って下さった沖縄県農業研究センター石垣支所の皆様、ならびに挿し木培地のサンプルを提供して下さった (株) ニッソーグリーン、松村アクア (株) および (株) サカタのタネの担当者様に厚くお礼申し上げます. 本研究は沖縄振興特別推進交付金による「うちな一島ヤサイ商品化支援技術開発事業」の一環として行われた.

引用文献

- Benjamini, Y. and Y. Hochberg (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. Royal Stat. Soc., Ser. B, Stat. Methodol.* 57: 289-300.
- Chadwick, L. C. (1933) Studies in plant propagation: the influence of chemicals, of the medium, and of the position of the basal cut on the rooting of evergreen and deciduous cuttings. *N. Y. Agric. Exp. Sta. Bull.* 571: 3-53.
- Chaveerach, A., P. Mookamul, R. Sudmoon and T. Tanee (2006) Ethnobotany of the genus *Piper* in Thailand. *Ethnobotany Research and Applications* 4: 223-231.
- Evizal, R. (2013) Development of pharmacognosy and agrotechnology of Java long pepper (*Piper retrofractum* Vahl). *Jurnal Agrotropika* 18: 34-40. (in Indonesian with English abstract)
- Hitchcock, A. E. (1928) Effect of peat moss and sand on rooting response of cuttings. *Bot. Gaz.* 86: 121-148 (with 3 plates).
- Lim, T. K. (2012) *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants: Volume 4, Fruits*. Springer Netherlands (Dordrecht) p.439.
- Luyen, B. T. T., B. H. Tai, N. P. Thao, S. Y. Yang, N. M. Cuong, Y. I. Kwon, H. D. Jang and Y. H. Kim (2014) A new phenylpropanoid and an alkylglycoside from *Piper retrofractum* leaves with their antioxidant and α -glucosidase inhibitory activity. *Bioorg. Med. Chem. Letters* 24: 4120-4124.
- 大野 豪・根本明子・宮里 進・東嘉弥真勇人・宮城徳道・山城信哉・玉城盛俊 (2016) 沖縄県におけるヒハツモドキの地理的分布と生育環境の特徴、ならびに害虫等による本種の被害・障害に関する予備的知見. *熱帯農業研究* 9: 1-11.
- 大野 豪・根本明子・玉城盛俊 (2018) 挿し木によるヒハ

ツモドキの増殖：挿し木に適する植物部位，挿し穂の節数，葉切除の程度ならびに時期の特定．沖縄農研セ研報 12: 29-42.

Takahashi, M., M. Ohshiro, S. Ohno, K. Yonamine, M. Arakaki and K. Wada (2017) Effects of solar- and oven-drying on physicochemical and antioxidant characteristics of hihatsumodoki (*Piper retrofractum* Var1) fruit. J. Food Process Preserv. 42: e13469 <https://doi.org/10.1111/jfpp.13469>

多和田真淳 (1981) 沖縄薬草 家庭栽培と薬効．新星図書出版 (那覇) p.447.

Weiss, E. A. (2002) Spice Crops. CABI Publishing (Wallingford) p.429.

山門健一 1996. 香りのまちづくり構想について．沖大経済論叢 19: 1-2.

Screening the rooting media for cutting propagation of Javanese long pepper, *Piper retrofractum* Vahl

Suguru OHNO^{1*}, Akiko NEMOTO² and Moritoshi TAMAKI³

1 Ishigaki Branch, Okinawa Prefectural Agricultural Research Center
(*Present affiliation: Okinawa Prefectural Plant Protection Center)

2 Ryukyusankei Co. Ltd.

3 Okinawa Prefectural Agricultural Research Center

Abstract

Javanese long pepper, *Piper retrofractum*, has been used as a traditional spice and medicinal plant in Okinawa Prefecture, southwestern Japan. Recently, this plant has been focused on for its functionality, but its cultivation techniques are not well-developed. As a part of experiments to establish a propagation technique for *P. retrofractum* using cuttings, we examined the rooting of climbing and creeping stems of this plant on several artificially formed and non-formed growing media. Although the previous study showed that phenolic resin foam for plant propagation (Oasis[®]) was a good rooting media for both types of stem, the present study further revealed that soft types of phenolic resin foam for flower arrangement (Aquafoam[®] Soft and Aquafoam[®] Standard), rockwool (Grodan[®]), Akadama soil, Kanuma pumice, river sand, and vermiculite produced high percentages of rooting similar to or higher than that of Oasis[®]. At present, therefore, these media are recommended to be used in cutting propagation of *P. retrofractum*. Rooting of climbing stems was also good in hard types of phenolic resin foam for flower arrangement (Aquafoam[®] Hard and Green Foam), formed soil (Plant Plug[®]), rice nursery soil (Kumiai Baido), and sphagnum moss, whereas creeping stems did not root well in these media, indicating that these can be used only for climbing stems. Peat moss was found to be inadequate as a rooting medium because rooting percentages were low for both types of stems.

Key words: Artificial propagation, cuttage, Piperaceae, Ryukyus, Yaeyama region.

原著論文

ニガウリ安定着果のための効果的な花粉保存技術の検討

谷合直樹¹⁾・平田雅輝²⁾・玉城盛俊²⁾

1) 沖縄県農業研究センター

2) 沖縄県農林水産部園芸振興課

要 約

沖縄県のニガウリ促成栽培では1~2月の低温による花粉の低温障害で、着果不良が発生し問題となっている。その対策として、花粉発芽率を向上させるために、花粉を長期冷凍保存する際の諸条件を検討した。‘汐風’を用いて検討したところ、4℃かつ低湿度で60分間処理（前処理）した後に-18℃で冷凍保存することにより、花粉発芽率が向上した。また、冷凍保存後に相対湿度99%で60分間処理（順化）すると、さらに花粉発芽率が向上した。これらの手法を適用して約60日間冷凍保存した花粉を用いて受粉したところ、高い着果率で高品質な果実が得られた。家庭用冷蔵庫を用いて簡易に行うことができる同手法は、ニガウリ促成栽培における低温期の問題解決に有効と考えられる。

キーワード

低温、花粉、低温、冷凍保存、前処理、順化处理

緒 言

ニガウリ (*Momordica charantia* L., ツルレイシ) は、沖縄県産野菜を代表する主要な品目である。平成4年には冬春期の施設栽培に適した品種‘汐風’が育成され、従前からの品種と合わせた活用により、本県の温暖な気候を活かした促成栽培が全県下に拡大してきた。しかしながら、長期取りの促成栽培では、生産の主要な時期である1~2月の果実生産が不安定であるという問題を抱えている。その主要因は、低温を受けた花粉の発育不良や発芽能力の低下、また葯の未裂開による結実不良であり、低温となりやすい沖縄本島北部で特にその問題が大きく、ひどい場合には1ヶ月以上受粉ができないこともある。

野菜類の促成栽培を行う際の低温対策技術として、ビニル被覆に加え、暖房機器による加温があげられる。しかし、導入や燃油のコスト等の課題が大きく、本県においては殆ど利用されていないのが現状である。一方、二重ビニルによる保温強化にも限界があるのが実情である。

果菜類における低温期の着果不良対策として、雄花が低温障害を受け受粉に適さない時期に、好適な時期に採集して保存しておいた花粉を用いて安定着果を図る技術がある。ニガウリは、-20℃の冷凍により130日以上花粉保存が可能とされている（川上ら, 2008）。しかし、その後の詳細な検討はなく生産者への技術普及も行われていないため、実用に

向けた技術開発が必要である。一方、花粉の酸化を防ぐため-25℃で窒素封入または真空の条件下で保存することにより、3ヶ月保存した花粉でも結実率および果実品質は当日採取した花粉と同等であることが明らかとなっている（Akutsu, 2016）。しかし、保存時の窒素封入や真空保存の専用機器を用意する必要があるため、生産者が同手法を用いるのは困難であり、簡易な手法の開発が必要である。

このような状況の中、いくつかの植物において、乾燥処理で花粉の含水率を下げておくことが、その後の冷凍での長期保存後の花粉発芽率に影響することが報告されている（Vadimら, 1999; 梶, 1980）。また、甘果オウトウにおいて、高湿度条件で順化した後の長期保存花粉は、発芽率が上昇すると報告されている（萩原ら, 2015）。ニガウリの花粉においても、乾燥後の冷凍保存や、受粉作業前の順化によって花粉発芽率が向上するならば、低温期の着果不良対策として活用できる可能性がある。

そこで、本研究では、生産者が自ら実施可能なことを念頭に、低温期の着果安定に向け、花粉の保存前処理と保存後の順化处理の検討を行った。その結果、簡便で実用的なニガウリ花粉の保存方法を確立したので報告する。

材料および方法

1. 花粉保存の前処理が保存後の発芽率に及ぼす影響

沖縄県農業研究センター内のニガウリ栽培施設で2016年10月13日に‘汐風’を3株×3区の計18株定植し栽培した。同年12月20日に4花/株の雄花を開花後直ちに採取し、葉包紙1包あたりに筆を用いて葯から擦り落とした12花分の花粉を包装した後、目合2mmのザルに入れ、暗黒条件下で①常温・低湿度（気温25℃・相対湿度35%）、②常温・高湿度（気温25℃・相対湿度99%）、③低温・低湿度（気温4℃・相対湿度20%）、④低温・高湿度（気温4℃・相対湿度99%）の環境条件に60分間静置した。60分間の静置時間は、Vadimら（1999）の実験でトウモロコシの花粉の乾燥時間60分が保存後に最も高い発芽率を得られていることより設定した。

前処理の後、花粉の入った葉包紙をポリエチレン袋（商品名：ジップロック、旭化成）で空気と同時に密閉し、-18℃条件下で保存した。

保存60日後に葉包紙から取り出した500～700個の花粉を、直ちに液体培地（ショ糖10%、ホウ酸0.08%）1mlと混和し、25℃条件下で120分間静置して花粉の発芽を促し、発芽率を調査した。発芽率は、おおむね花粉の直径以上花粉管が伸長しているものを発芽花粉と見なし、1視野あたり花粉数200個を培地上で肉眼により検鏡して求めた。

2. 花粉保存後の順化処理が花粉の発芽率に及ぼす影響

保存前処理試験と同日、同様に採取した花粉（発芽率94%）を葉包紙で包装した後、ポリエチレン袋に入れて密閉し、-18℃条件下で保存した。保存60日後に葉包紙のまま花粉を①高湿度区（相対湿度99%・気温25℃）、②中湿度区（相対湿度64%・気温25℃）、③低湿度区（相対湿度35%・気温25℃）の各環境条件下に80分間静置した。①高湿度処理区では、密閉容器に十分に湿らせた脱脂綿と保存花粉を葉包紙が濡れないように同時に密閉容器に入れた後、80分間静置した。②中湿度区では湿度64%の室内に静置した。③低湿度区では花粉の入った葉包紙をザルに入れ、そのままインキュベーター（湿度35%）に静置して行った。静置後に保存前処理と同様に花粉の発芽処理を行い、発芽率を20分間隔で調査した。

3. 家庭用冷凍冷蔵庫で簡易冷凍保存したニガウリ花粉を用いて受粉した果実品質と着果率

沖縄県農業研究センター内のニガウリ栽培施設で2016年10月13日に‘汐風’を18株定植し栽培した。同年12月10日に開花直後の雄花4花/株を採取し、

前処理として、葯から筆で擦り落とした花粉を1包あたり12花分の花粉を葉包紙に包み、計6包を作成した。その後、ザルに入れて家庭用冷蔵庫（気温4.2℃・相対湿度20%）で60分間処理した後、ポリエチレン袋で密閉して-17℃の冷凍庫で受粉予定日の2017年2月12日まで64日間保存した。受粉日に保存花粉を冷凍庫から取り出し、ポリエチレン袋の中に湿った脱脂綿を葉包紙が濡れないように封入して湿度を高め、気温25℃・相対湿度99%環境条件下で60分順化処理を行った後、10時から11時の間に同施設のニガウリ1株につき1雌花に対し筆を用いて雄花6花分の花粉を柱頭全体に花粉を付着させ受粉を行った。これを12株分実施した。対照区として、受粉日である2017年2月12日に開花した雄花を開花後120分以内に採取し、これより得られた発芽率92%の正常花粉を用いて、保存花粉区と同施設のニガウリ1株に対し雄花1花分の花粉を柱頭全体に花粉を付着させ受粉を行った。これを保存花粉区と同様に12株分実施した。受粉から25日後に果径5.5cm以上に肥大した果実特性および着果率を調査した。着果率は受粉数に対し受粉から25日後に果径5.5cm以上に肥大した果実数の割合で求め、果実特性はその収穫果実の果実重、果長、内部種子粒数の調査によって求めた。

結果および考察

1. 花粉保存の前処理が保存後の発芽率に及ぼす影響

花粉を長期保存する前の花粉の発芽率と各前処理を行って60日間保存した花粉の発芽率を第1図に示す。

60日冷凍保存後における各前処理の発芽率は、低温・低湿度区が76%と最も高く、次いで低温・高湿度区の54%、常温・低湿度区の53%となり、常温・高湿度区の34%が最も低くなった。

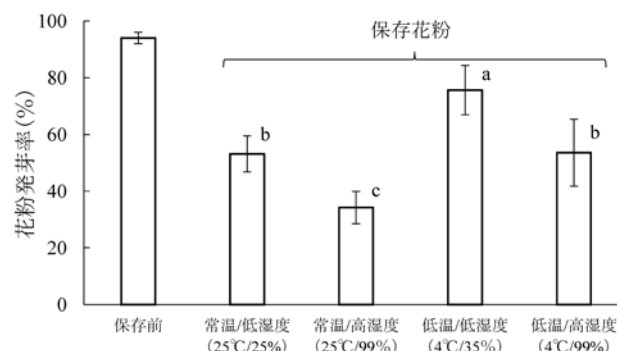


図1 保存前処理手法の違いによる花粉発芽率

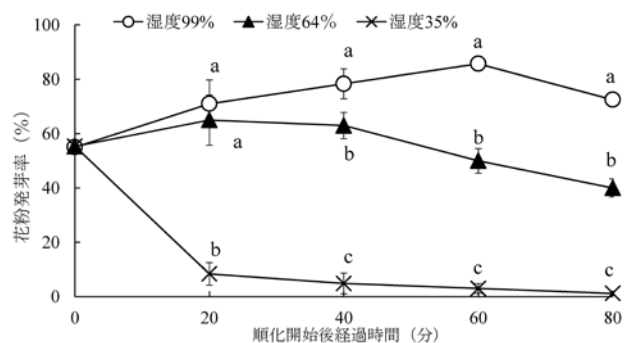
アークサイン変換後、Tukey-Kramer法の多重比較検定により、異符号間には1%水準で有意差があることを示す (n=6)。

トドマツでは、比較的含水率の高い花粉が貯蔵期間中に急激に発芽能力を失う原因は、発芽能力に支障をきたすような細胞内凍結を引き起こすためと考察されている(梶, 1980)。ニガウリにおいても、低湿度環境に晒す処理を冷凍保存前に行うことにより、花粉が乾燥し含水率が低下したために、保存後の花粉発芽率が向上したためと考えられる。沖縄県のニガウリ促成栽培では花粉の採取適期である11～12月から保存花粉が必要な低温期の1～2月までの間が約60日であり、最低必要なこの期間に花粉発芽率70%以上を確保できることから実用的な技術といえる。

また、保存前処理において、低温・低湿度区が常温・低湿度区よりも保存後発芽率が高くなったことより、温度を低く保つことも重要な前処理条件であることが明らかになった。ニガウリの花粉は真空包装して4℃で保存すると28日後でも50%以上の発芽率を示す(阿久津, 2015)ことから、低温環境下で花粉の活性を抑えることは保存条件として有効であり、保存前処理においても低温で乾燥させる方が保存後の発芽率には効果があると思われた。

2. 冷凍保存後の順化処理が花粉の発芽率に及ぼす影響

各処理区における20分毎の花粉発芽率の推移を第2図に示す。各処理区ともに60日間冷凍保存直後の花粉発芽率は55%であった。相対湿度99%の高湿度区では、順化開始後に花粉発芽率は徐々に高くなり60分後に85%まで高まったが80分後には72%まで低下した。中湿度区では、処理開始後20分後に花粉発芽率65%まで高まり、40分後まで63%を維持したがその後は徐々に低下し80分後には40%となった。低湿度区では処理開始後20分後には花粉発芽率は8%まで急激に低下し、その後は5%以下で推移した。



第2図 花粉保存後の順化処理の違いによる発芽率

図中の垂線は標準偏差を示す(n=6)。異符号間には、アークサイン変換後、Tukey-Kramer法の多重比較検定により5%水準で有意差あり。

トウモロコシの花粉では、液体窒素による超低温保存の前処理として花粉の含水率を12%前後まで乾燥させ、保存花粉の解凍後、緩やかな再吸湿処理を行うことにより、保存花粉の交配による雑種子が得られている(Vadimら, 1999)。またモモやスモモ、オウトウでも、貯蔵した花粉の発芽率は順化を行う際の湿度の影響を強く受け、湿度90%程度の多湿条件で順化させると高い発芽率が得られるとされている(萩原ら, 2010)。ニガウリにおいても、保存後に高湿度条件で順化することにより順化開始から60分後までは花粉発芽率が向上しており、低湿度条件で順化すると短時間で急激に発芽率が低下することから、保存花粉を生産現場で利用する際にはできる限り乾燥した環境に置かないことが重要と考えられる。スモモやオウトウでは、多湿条件で順化を行う場合、短時間であれば発芽率に対する湿度の影響は小さいが、25℃以上の高温で長時間順化させると発芽率が著しく低下するとされている。ニガウリにおいても25℃の高湿度条件で静置した場合は80分後に花粉発芽率が低下したことより比較的高い温度条件では花粉の発芽能力は一定時間を経過すると急激に低下すると考えられる。以上より、25℃で保存花粉を順化処理する場合には、高湿度条件で60分程度静置し、順化後はすぐに使用することが望ましい。

3. 家庭用冷蔵庫で簡易冷凍保存した花粉を用いて受粉したニガウリ果実品質と着果率

ニガウリ果実の品質および着果率について、保存花粉と正常花粉との比較を第1表に示す。前処理を行い保存後に順化処理を行った花粉の発芽率は82%であった。この保存花粉を用いて受粉して得られた果実は、花粉で得られた果実と比較して果実重、果実長、種子数に有意な差は見られず、着果率は83.3%と高かった。

第1表 保存花粉を利用した果実品質と着果率

受粉花粉	果実重 (g)	果実長 (cm)	種子数	着果率 (%)
正常花粉 ^z	190.0 ± 18.6	21.2 ± 2.4	18.8 ± 7.3	75.0
保存花粉 ^y	190.0 ± 30.7	22.5 ± 2.6	14.7 ± 4.8	83.3
有意差 ^x	NS	NS	NS	NS

^z 受粉日である2017年2月12日に咲いた雄花の正常な花粉(発芽率92%)を用いて受粉した。

^y 2016年12月10日に保存した発芽率82%の63日間保存花粉を用いて受粉した。

^x NS: 有意差なし, p > 0.05 (T-test, n=12) 着果率は、アークサイン変換後に有意差判定した。

家庭用冷蔵庫を用いた簡易冷凍保存においても、約60日間高い発芽率を維持し、さらに圃場試験において正常な果実が得られたことから、本技術により作出した保存花粉は十分な受粉能力を有していることが分かった。本技術は高度な機器の要らない誰でも利用可能な技術であるため、技術マニュアル(沖縄県農林水産部園芸振興課, 2017)等を活用しながら

ら、例年低温により着果が安定しない生産者への普及が望まれる。また、本実験では比較的ニガウリ花粉の低温障害の少ない沖縄本島南部地域で受粉を行ったが、川上ら(2008)はニガウリの保存花粉による受粉実験で、受粉日の平均気温15.0℃・最低気温12.8℃以下になると花粉が正常でも着果率が低下すると報告しているため、保存花粉を利用する環境では、平均気温を高めるよう日中も小まめに保温管理し、放射冷却が予想される場合には夜間の換気を促すなどのハウス管理も望まれる。

本技術は、農家が自前の家庭用冷蔵庫を用いて花粉を長期保存し、低温期に利用することを想定したものであるが、ニガウリの受粉作業は受粉の回数や株当たりの着果数も多いことから、低温期の1～2月期のみを利用することを想定しても、大量の花粉を保存する必要がある。そのため、今後は更に効率的な花粉の採取方法や保存手法、効率的な受粉手法を開発する必要がある。

引用文献

阿久津雅子(2015), ニガウリ花粉の長期保存方法. 園芸学研究第14巻別冊1:350

Akutsu M.(2016) ,Effective long-term storage methods for pollen in bitter gourd (*Momordica charantia* L.) .Proceedings of XIth Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae:197-198

川上光男・喜友納栄輝(2008), 低温期におけるニガウリ花粉の保存利用. 沖縄農業研究会第47回大会講演要旨:23-24

沖縄県農林水産部園芸振興課(2017), ゴーヤー技術マニュアル「ゴーヤーの低温感受性と花粉の長期保存技術」:3-4

梶勝次(1980), トドマツ花粉の採集, 貯蔵および発芽検定に関する研究. 北海道林業試験場報告第18号:1-9

萩原栄揮・富田晃・土橋路子・新谷勝広(2010), モモ, スモモ, オウトウの貯蔵花粉の発芽率を向上させる順化方法. 山梨県果樹試験場普及成果情報:1-2

萩原栄揮・富田晃・山下(土橋)路子・新谷勝広(2015), 貯蔵花粉の順化条件が甘果オウトウ(*Prunus avium* L.)の花粉活性と結実率に及ぼす影響, 園芸学研究.14(1):37-41

Vadim M. Y.・奥村健治・鶴見義郎・村木正則・蝦名真澄(1999), 乾燥処理, 再吸湿処理がトウモロコシの超低温保存花粉発芽に及ぼす影響. 日本草地学会誌.45:132-133

Examination of effective pollen preservation methods for stable fruit production of bitter gourd (*Momordica charantia* L.)

Naoki TANIAI¹⁾, Masaki HIRATA²⁾, Moritoshi TAMAKI²⁾

1) Okinawa Prefectural Agricultural Research Center, 820, Makabe, Itoman city, Okinawa, 901-0336, JAPAN

2) Okinawa Prefectural Gardening Promotion Division, 1-2-2, Izumizaki, Naha, Okinawa, 900-8570, JAPAN

Abstract

Reduced levels of fruiting due to low temperature damage in January and February in the Okinawa Prefecture have become a problem. This study aimed to increase pollen germinating rates after pollen was stored in a freezer for a long period. Using 'Shiokaze' pollen exposed to a temperature of 4 °C and a low relative humidity for 60 minutes after being stored in a freezer at -18°C, the germination rate of pollen was increased. Furthermore, when acclimatized for 60 minutes in a relative humidity of 99% after preservation, the germinating rate of the pollen increased further. Pollination using pollen stored for approximately 60 days using these methods resulted in a high germination rate, with no abnormalities observed in the fruit. These methods can be easily implemented using a household refrigerator are effective for preventing low-temperature damage in forcing culture of bitter gourd.

Keywords: low temperature, pollen, promote, frozen preservation, pretreatment, acclimation

原著論文

マンゴー「アーウィン」と「キーツ」の交雑実生集団と自殖実生集団の形質比較

仲村昌剛¹・松村まさと¹・與儀喜代政²・尾上（牧志）祐子³
保坂ふみ子⁴・山本俊哉⁴

1 沖縄県農業研究センター名護支所

2 沖縄県農業研究センター

3 沖縄県農業研究センター 退職

4 農研機構果樹茶業研究部門 品種育成研究領域 ゲノムユニット

要 約

マンゴー育種において品種間交雑と自殖交配の育種選抜における有用性を確認するために、「アーウィン」と「キーツ」の交雑実生集団（以下、交雑集団）と「アーウィン」自殖実生集団（以下、自殖集団）における果実形質の平均値、出現頻度分布や分散値、選抜水準を超える個体の出現率を算出し比較を行った。その結果、果実形質の平均値を比較すると、交雑集団では自殖集団に比べて収穫日が遅く、果実重が重く果肉障害発生度が高く、果皮色の赤色が若干薄かった。糖度および果肉色は両集団で有意差は確認できなかった。果実形質の出現頻度分布の比較より、果実重および果肉障害発生度において交雑集団の方が自殖集団よりも分散値が高く山型のグラフとなった。果実形質の集団平均値と交配親平均値との比較より、自殖集団が「アーウィン」よりも果実重が有意に軽かった。選抜水準を超える個体（果実重 400g 以上、糖度（° Brix）15 度以上、果梗部の果皮色が赤色系、果肉障害発生度 10 未満を満たす個体）の出現率は、交雑集団の方が自殖集団よりも高かった。以上より、交雑集団は自殖集団よりも果実重に関連する遺伝子座で多様な遺伝子型が分離し選抜水準を超える個体を多く作出できる育種的な利点がある事が分かった。また、マンゴーにおいても果実重で自殖弱勢が働く事も分かった。そのため、沖縄県におけるマンゴー育種においては自殖集団より交雑集団を用いるべきであると結論づけた。

キーワード：育種、果実重、DNA マーカー、品種間交雑、自殖弱勢

緒 言

マンゴー (*Mangifera indica* L.) はウルシ科マンゴー属の植物で、熱帯アジア原産、北緯 30 度から南緯 30 度の間で栽培されている（米本，2016）。日本へは、1897 年（明治 30 年）に本県に、大正初期には鹿児島県に導入され、当初、露地栽培で栽培されていたため開花期の低温と降雨によって結果させられなかったが、1970 年代にビニール被覆をして結果を安定させる栽培法が鹿児島県農業試験場・大島支場で開発されてから南西諸島や本県で注目された（米本，2016）。さらに本県では、1980～1990 年代初頭にかけて県全域でミバエが根絶された事でミバエを殺虫するための果実への蒸熱処理作業を行わず容易に本土へ出荷されるようになった（米本，2016）。それらの要因などによって、本県のマンゴー収穫量は 1990 年代前半から急激に増大し、1996 年には 1020t となり 2015 年には 2035t と 2000t を超えるなど、マンゴーは沖縄ブランドを代表する果樹品目となっている（沖縄県，2018）。しかしながら、2000 年代以降から宮崎県など他県の生産量も増加傾向であり、フィリピンやメキシコなどからの輸入品も増

加しており（菊池ら，2011）、他産地との産地間競争が近年激化しつつある。産地間競争に対応するには、連年安定着果技術や病虫害対策方法などの栽培管理技術の開発や普及活動に加えて、沖縄ブランドをさらに確立し他地域との差別化を促進する活動も重要となる。そのため、他産地でも栽培されている品種である「アーウィン」とは異なる、沖縄県独自の優良品種開発が急務な課題となっている。そこで、沖縄県農業研究センター名護支所では 2009 年からマンゴーの品種開発を開始し、食味や果皮色に優れる「アーウィン」と、炭疽病抵抗性や連年着果性など優良形質を持つ海外導入品種を交雑し（澤岬，2018。仲村，2018）、現在得られた実生の選抜を行っている。

しかし、マンゴー品種の多くは自家和合性である事、そして、品種間交雑が虫媒で行われるため、獲得した実生には一定程度の自殖個体が含まれている。一般に他殖性である果樹の自殖個体では樹勢の低下や果実重の減少等が起こる自殖弱勢（近交弱勢）が発生することが報告されている。事例としては、ニホンナシで Sato *et al.* (2008) が、家系ごとに見た近交係数と 1 年生実生の伸長量との関係を調

べ、近交係数が増大する（近交弱勢が強まると）とともに実生の伸長量が減少する事を報告している。ブルーベリーについて Lyrene (1983) は、自殖実生集団と交雑実生集団について実生の樹高と新梢の径を測定し、両形質とも自殖実生集団が交雑実生集団に比べて顕著に小さい事を報告した。また、カキでは Yamada *et al.* (1994) が実生集団の果実重について、近交係数が高まることによって果実が小玉化する事を統計的な手法を用いて証明している。このように他の果樹では自殖弱勢や近交弱勢の報告があるが、日本におけるマンゴー育種では報告されていない。マンゴー育種に関する研究報告として、海外においては Lavi *et al.* (1989) が「パルマー」と「ケント」、 「キーツ」を交配母本とした後代実生の果実形質における出現頻度グラフの比較や果実形質間の相関分析などの統計分析を行い、マンゴーにおける後代実生の果実形質に対する交配母本の影響についての考察を行っている。また、日本国内においては Honsho *et al.* (2012) が「アーウィン」と「紅キーツ」を自然交配して獲得した実生集団に対して SSR マーカーを用いた交雑確認を行い、効率的な交雑後代獲得の検討を行っている。どちらの報告もマンゴー育種において有益な情報ではあるが、交雑実生と自殖実生を養成して着果した果実形質の比較や自殖弱勢の有無などの検証は実施されていない。

そこで本研究では、「アーウィン」と「キーツ」の交雑実生集団（以下、交雑集団）と「アーウィン」自殖実生集団（以下、自殖集団）の果実形質を評価し、集団間の比較、交配親と交雑集団の形質の関係、選抜水準を超える実生個体の出現率の比較などにより、マンゴー育種における品種間交雑の有用性や自殖弱勢の有無を検討することを目的とした。

材 料

供試樹

調査樹は沖縄県農業研究センター名護支所において 2009～2010 年に「アーウィン」に「キーツ」を交配して得た実生 46 個体および「アーウィン」の

自殖によって得た実生 22 個体、これらの実生と同様に鉢上げを行った「アーウィン」および「キーツ」樹を 1 樹ずつ供試した。供試樹の樹齢は、いずれも 2017 年に 7～8 年生であった。

栽培管理

実生個体は栽培面積の省力化のため、H 鋼ハウス (20m × 25m) 内に自根で 80L ポットに栽培し、一文字整枝法（鹿児島県, 2004. 米本, 2016）で管理を行った。また、同ハウスで「アーウィン」は一文字整枝法で、「キーツ」は杯状仕立て法での管理を行っている。栽培管理については全ての供試樹と同様に行い、施肥はマンゴー肥料 1 号 (N:P:K = 5:7:5) を 3 月、5 月に各樹の樹幹周囲に実施した。灌水は樹幹周囲に設置した点滴チューブより、午前 9 時頃に 20～30 分間、土表面全体が湿る程度に週 3 回、夏も冬も同様に与えた。病虫害防除は、沖縄県果樹栽培要領（沖縄県, 2011）に従って実施した。

交雑確認方法

2013 年に「アーウィン」と「キーツ」の交配実生の葉から DNeasy 法 (QIAGEN 社) で DNA を抽出した。その後、親子関係を確認するために農研機構果樹茶業研究部門品種育成研究領域ゲノムユニットで既存の 5 種類の SSR マーカー (MiIHR19, MiIHR26, MiIHR36, MiSHRS-4, LMMA4) を用いて交雑判定を行った (表 1)。PCR プログラムは、94℃ で 5 分の熱変性後、熱変性 94℃ で 1 分—アニーリング 55℃ で 1 分—伸長 72℃ で 1 分を 35 サイクル、最終伸長 72℃ を 7 分行い、PCR 増幅産物は DNA シーケンサ Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer (Life Technologies 社) により、分離・検出後、ソフトウェア GeneMapper (Life Technologies 社) を用い波形データの解析を行った。「アーウィン」と「キーツ」からそれぞれ 1 つずつの SSR 対立遺伝子を持つ個体を交雑個体、「アーウィン」の持つ SSR 対立遺伝子のみを持ち、「キーツ」の SSR 対立遺伝子を持たない個体を自殖個体と判断した。

表1 供試したプライマーの特徴

遺伝子座	核酸配列 データベース No.	反復モチーフ	引用元の文献	アーウィン	キーツ
MiIHR19	EF592199	(AC) ₁₁	Ravishankar et al.(2011)	193/205	195/195
MiIHR26	EF592206	(GA) ₁₄ GGA(GAA) ₂	Ravishankar et al.(2011)	145/164	149/151
MiIHR36	EF5902216	(TC) ₁₇	Ravishankar et al.(2011)	228/248	232/234
MiSHRS-4	AY942818	(CT/AG) ₁₁	Schnell et al.(2005)	135/139	133/139
LMMA4	AY628376	(AC) ₁₅	Viruel et al.(2005)	237/237	231/247

調査に用いた実生個体数およびデータ分析のための統計的な処理について

2017年に着果した交雑集団39個体と自殖集団15個体および、2018年に着果した交雑集団38個体と自殖集団11個体のうち、環境や調査条件などの非遺伝的要因の個体間差を少なくするため、5果以上調査できた個体（2017年は交雑集団30個体と自殖個体10個体、2018年は交雑集団30個体と7個体）を選出した。6果以上調査できた個体については、Excelのランダム関数「=RAND（）」を用いて無作為に5果を抽出し、それらの果実形質データを分析に用いた。なお、交配親である「アーウィン」および「キーツ」の果実形質データも実生個体と同様の方法で無作為に5果を抽出して分析に用いた。

調査方法

交雑集団と自殖集団における果実形質の集団平均値の比較

交雑集団と自殖集団で果実形質にどのような違いが見られるのか測定値を比較した。果実形質調査は7月から10月にかけて調査した。果実は袋の外から果皮に着色が見られた時、結果枝から自然に離脱した時、または袋外から果実を触って弾力を感じた時に収穫を行った。収穫後に果実重を調査した後、室温25℃のクーラー室内で果実を追熟させ、果実表面を指で押してみて柔らかくなった時を追熟完了とし、果皮色、果肉色、果肉障害発生度、糖度（°Brix、以下、糖度）を調査した。果皮色（果梗部、果頂部）と果肉色は農林水産省植物種類別審査基準「マンゴー種特性表」（農林水産省、2018）を参考に表2の指標を作成し目視で6段階に点数化して評価した。果肉障害発生度は、果実内部がゼリー状に変化する果肉崩壊の発生面積を4段階（程度1：果実断面1/4程度が果肉崩壊、程度2：果実断面1/2程度が果肉崩壊、程度3：果実断面3/4程度が果肉崩壊、程度4：果実断面全体が果肉崩壊）に数値化し目測で測定し、（程度1×個数+程度2×個数+程度3×個数+程度4×個数）/（4×全個数）×100

表2 マンゴー果実品質調査の各項目の点数

点数	0	1	2	3	4	5	6
果皮色	—	緑	黄	橙	桃紅	深紅	紫紅
果肉色	—	黄緑	淡黄	黄	黄橙	橙	赤橙
果肉障害	無し	1/4程度	1/2程度	3/4程度	全体	—	—

※果肉障害発生度 = (程度1×個数+程度2×個数+程度3×個数+程度4×個数) / (4×全個数) ×100

の式で算出した。糖度の分析にはNH-2000(HORIBA)を使用した。

果実形質の出現頻度分布の比較および統計的特徴の把握

果実形質において、表現型値がどのように分布しているのか、交雑集団と自殖集団で偏差に違いがあるのか確認するため、表現値の出現頻度分布グラフを作成し各集団の特徴を把握した。また、正規分布に適合するか検証するため、両集団に対してコルモゴロフ-スミルノフ検定を実施した。さらに、各果実形質の不偏分散値を算出して両集団でF検定を実施し、出現頻度分布における両集団の統計的な違いを比較した。なお、果実重においては2018年の交雑集団で平均値と標準偏差に相関が認められたため($r = 0.38^*$)、原尺度(g)に加え、対数変換値も用いて比較した。

果実形質の集団平均値と交配親平均値との比較

実生集団と交配親との関係性を把握するため、2017年と2018年の実生集団と交配親の果実形質の測定値を比較した。なお、果実重については対数変換値も用いて比較した。

選抜水準を超える個体の出現率の比較

現在、沖縄県農業研究センターのマンゴー育種における選抜目標は、果実重400g以上かつ糖度15度以上、果皮色（果梗部）が赤色系（実数値3.5以上）、果肉障害発生度10未満である。この選抜水準を超える実生個体の出現率（優良形質を備えた個体数/全個体数）を、交雑集団および自殖集団で算出し比較した。

結果

交雑集団と自殖集団における果実形質の集団平均値の比較

交雑集団と自殖集団の果実形質の比較を表3に示す。平均収穫日は2017年では交雑集団が8月24日で自殖集団が7月29日、2018年では交雑集団が8月20日で自殖集団が7月21日となり、交雑集団の方が自殖集団に比べて1ヶ月ほど遅かった。

表3 「アーウィン」×「キーツ」交雑集団と「アーウィン」自殖集団における果実形質特性（2017年および2018年）

	調査個体数	分析果数 (調査果数)	収穫日	果実重 (g)	果皮色 (果梗部 : 1~6)	果皮色 (果頂部 : 1~6)	果肉色 (1~6)	果肉障害 発生度 (0~100)	糖度 (° Brix)
2017年調査	交雑集団	30	150(367)	8月29日	592	3.5	2.0	3.4	14.5
	自殖集団	10	50(110)	7月29日	309	4.3	2.6	3.6	2.6
	集団間の有意差			*	**	**	*	n.s	*
2017年調査	アーウィン	1	5(29)	8月2日	316	4.6	3.4	3.6	5.0
	キーツ	1	5(13)	9月1日	703	1.8	1.0	4.3	25.0
	交雑集団	30	150(502)	8月20日	659	3.6	1.8	4.1	22.8
2018年調査	自殖集団	7	35(98)	7月21日	246	3.5	2.0	4.0	4.3
	集団間の有意差			**	**	n.s	n.s	n.s	*
	アーウィン	1	5(22)	7月19日	352	4.8	2.0	4.0	0.0
キーツ	1	5(12)	9月10日	723	2.6	1.0	3.8	30.0	

※表中の値は1個体1樹5果（5果以上の個体はランダム係数で無作為に5果を抽出）のデータの平均値。*は5%以下、**は1%以下で有意差あり、NSは有意差無し（果実重は対数変換値を、収穫日は7月1日を基準日とした日差をマンホイットニーのU検定、それ以外の項目は実数値に対してマンホイットニーのU検定）。交雑集団および自殖集団、「アーウィン」は一文字整枝法でのデータ、「キーツ」は杯状仕立て法でのデータ。

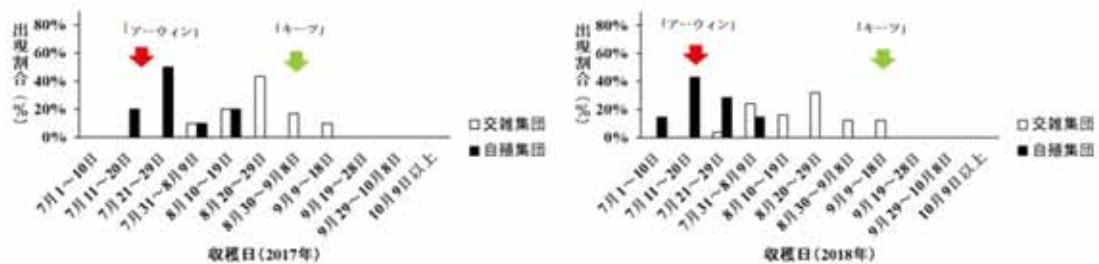


図1 「アーウィン」×「キーツ」交雑集団と「アーウィン」自殖集団における収穫日の出現頻度グラフ（左：2017年，右：2018年）

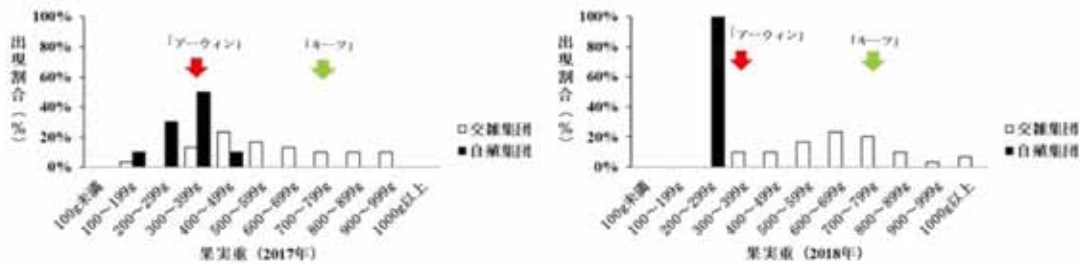


図2 「アーウィン」×「キーツ」交雑集団と「アーウィン」自殖集団における果実重（実数値）の出現頻度グラフ（左：2017年，右：2018年）

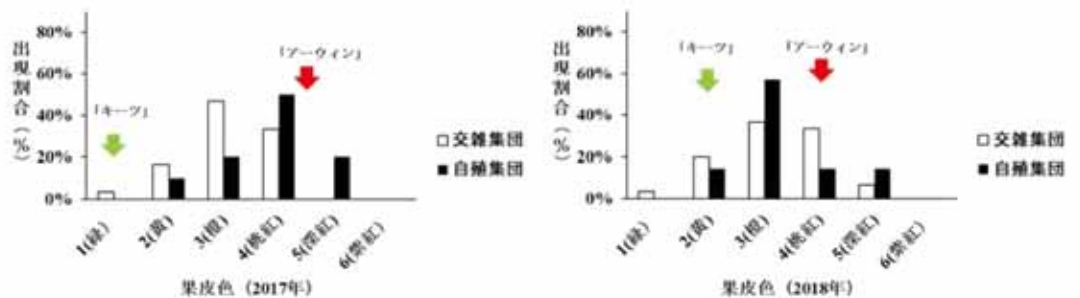


図3 「アーウィン」×「キーツ」交雑集団と「アーウィン」自殖集団における果皮色（果梗部）の出現頻度グラフ（左：2017年，右：2018年）

果実重は2017年では交雑集団が592gで自殖集団が309g、2018年では交雑集団が659gで自殖集団が246gとなり、交雑集団の方が自殖集団より有意に重かった ($p < 0.01$)。果梗部～果頂部の果皮色は、2017年では交雑集団が3.5(桃紅～橙色)～2(黄色)、自殖集団が4.3(桃紅色)～2.6(橙～黄色)となり

交雑集団が自殖集団より赤色が若干薄い傾向が見られた。しかし、2018年では交雑集団で3.6(桃紅～橙色)～1.8(黄～緑色)、自殖集団で3.5(桃紅～橙色)～2(黄色)となり両集団で有意な差は確認できなかった。果肉色は2017年で交雑集団が3.4(黄橙～黄色)で自殖集団が3.6(黄橙～黄色)、2018年

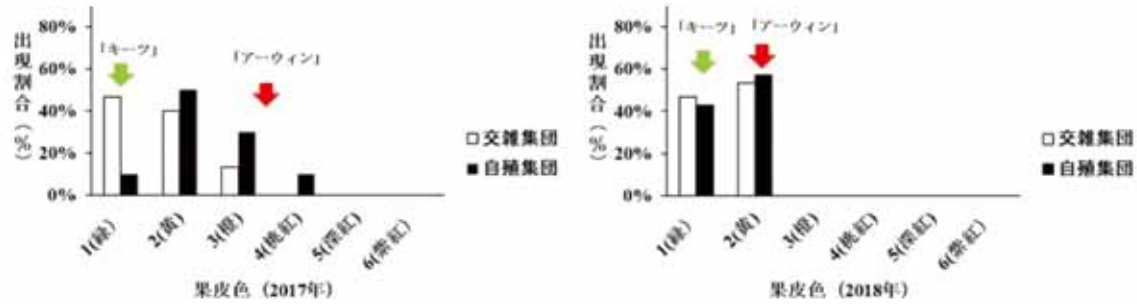


図4 「アーウィン」×「キーツ」交雑集団と「アーウィン」自殖集団における果皮色（果頂部）の出現頻度グラフ（左：2017年，右：2018年）

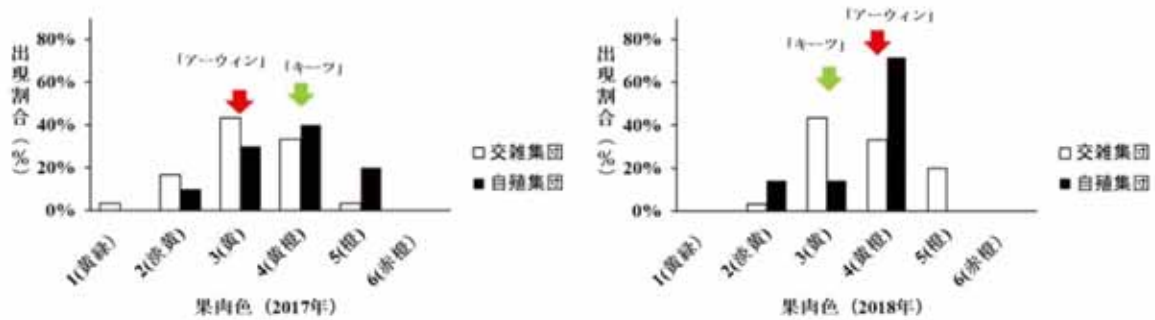


図5 「アーウィン」×「キーツ」交雑集団と「アーウィン」自殖集団における果肉色の出現頻度グラフ（左：2017年，右：2018年）

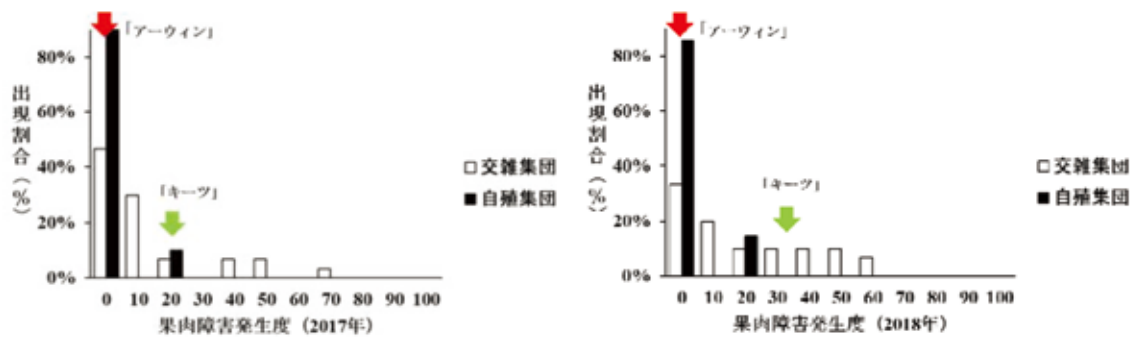


図6 「アーウィン」×「キーツ」交雑集団と「アーウィン」自殖集団における果肉障害発生度の出現頻度グラフ（左：2017年，右：2018年）

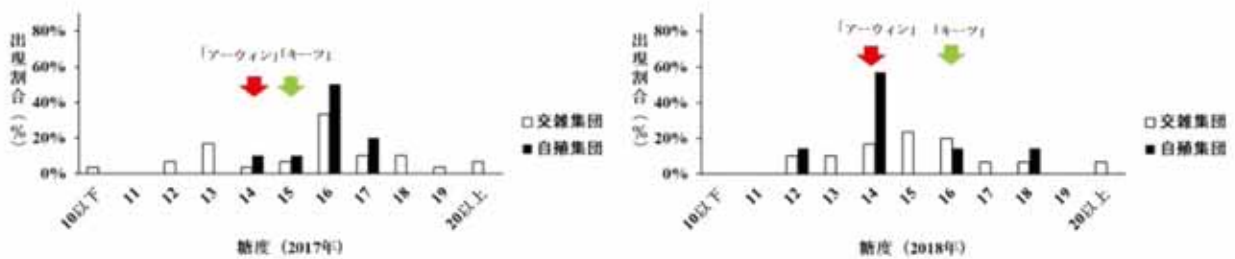


図7 「アーウィン」×「キーツ」交雑集団と「アーウィン」自殖集団における糖度の出現頻度グラフ（左：2017年，右：2018年）

表4 両集団における果実形質の出現頻度分布の正規性検定と分散値比較 (2017年, 2018年)

		収穫日	果実重 (g : 実数値)	果実重 (g : 対数値)	果皮色 (果梗部 : 1~6)	果皮色 (果頂部 : 1~6)	果肉色 (1~6)	果肉障害 発生度 (0~100)	糖度 (° Brix)	
2017年	交雑集団	正規分布との 有意差 (p値)	n.s (≥0.10)	n.s (≥0.10)	n.s (≥0.10)	n.s (0.0514)	n.s (≥0.10)	n.s (≥0.10)	** (0.0005)	n.s (≥0.10)
		分散値	119.6	40803	0.0265	0.470	0.4907	0.6522	354.4	7.47
	自殖集団	正規分布との 有意差 (p値)	n.s (≥0.10)	n.s (≥0.10)	n.s (≥0.10)	n.s (0.0939)	n.s (≥0.10)	n.s (≥0.10)	** (0.0000)	* (0.026)
		分散値	100.9	4860	0.0120	1.184	0.7669	0.6851	41.1	7.18
		両集団の分散値の 有意差	n.s (0.4169)	** (0.0011)	n.s (0.1057)	* (0.0288)	n.s (0.1735)	n.s (0.4262)	** (0.001)	n.s (0.5096)
2018年	交雑集団	正規分布との 有意差 (p値)	n.s (≥0.10)	n.s (≥0.10)	n.s (≥0.10)	n.s (≥0.10)	** (0.0055)	n.s (≥0.10)	** (0.0044)	n.s (≥0.10)
		分散値	177.04	39438	0.0171	0.9695	0.3000	0.5352	437.4	5.14
	自殖集団	正規分布との 有意差 (p値)	n.s (≥0.10)	n.s (≥0.10)	n.s (≥0.10)	n.s (≥0.10)	n.s (≥0.10)	n.s (≥0.10)	* (0.0308)	n.s (≥0.10)
		分散値	67.3	559	0.0016	0.6762	0.5924	0.3867	48.2	3.83
		両集団の分散値の 有意差	n.s (0.1143)	** (1.5E-05)	** (0.0036)	n.s (0.3462)	n.s (0.102)	n.s (0.3651)	** (0.003)	n.s (0.3814)

※正規性の判断はコルモゴロフ=スミルノフ検定, 分散値の推定はF検定より算出した。*は5%以下, **は1%以下で有意差あり, NSは有意差無し, 括弧内の数値はp値。

で交雑集団が 4.1 (黄橙色) で自殖集団が 4 (黄橙色) となり, 各年で違いがあるものの集団間での有意差は確認できなかった。果肉障害発生度は 2017 年で交雑集団が 14.5 で自殖集団が 2.6, 2018 年で交雑集団が 22.8 で自殖集団が 4.3 となり, 交雑集団の方が自殖集団に比べて有意に高かった (p<0.05)。糖度は 2017 年で交雑集団が 16.1 度で自殖集団が 15.3 度, 2018 年は 15.7 度で自殖集団が 15.1 度となり, 交雑集団の方が自殖集団より高かったが有意差は確認できなかった。

果実形質の出現頻度分布の比較

両集団における果実形質の表現値の出現頻度分布グラフと正規性検定および分散値の結果を図 1~7 と表 4 に示す。収穫日は, 2017 年および 2018 年の 2 年ともに, 交雑集団は 8 月 20~29 日, 自殖集団は 7 月 20~29 日を中心に正規分布となり等分散であった。果実重において, 交雑集団は 2017 年で 400~499g, 2018 年で 600~699g で出現頻度が高かった。自殖集団は 2017 年で 300~399g で出現頻度が高く, 2018 年は全個体が 200~299g の範囲内であった。分布の形状は両集団ともに正規性が確認されたが, 交雑集団は「キーツ」以上の果実重である 800~899g や 1000g 以上の個体が 10% 程度見られ傾斜が緩やかで幅の広い山型の形状となった。分散値は交雑集団の方が自殖集団より高く, 実数値と 2018 年の対数変換値で有意差を確認できた。果皮色について, 交雑集団では果梗部が 3 (橙色) で出現頻度が高く山型の形状を示し正規性が確認された。果頂部は 1~2 (緑~黄色) に多く分布し, 2018 年は正規性が確認できなかった。自殖集団では果梗部は 3~4 (橙~桃紅色), 果頂部では 2 (黄色) で多く分布していた。両集団で分散値の有意差は確認できなかった。果肉色において, 交雑集団は 3 (黄色) で高い分布を示し山形の分布となり正規性が確認できた。自殖集団は 4 (黄橙色) で高い分布を示し, 統

計で正規性を示したものの 2018 年は 75% が 4 (黄橙色) に分布していた。果肉障害発生度において, 両集団ともに果肉障害発生度 0 に多く分布し正規分布ではなかった。また, 交雑集団の方が自殖集団より分散値が明らかに高く有意差を示した (p<0.01)。糖度において, 交雑集団は 2017 年で 16 度, 2018 年で 15 度に多く分布し, そこを中心として傾斜が緩やかな山型の正規分布を形成していた。自殖集団は 2017 年で 16 度, 2018 年で 14 度に 50~60% 分布し, 釣鐘型のグラフを形成しており, 2017 年の分布は正規性を示していなかった。分散値は 2 年ともに交雑集団の方が自殖集団より高かったが有意差は確認できなかった。

果実形質の集団平均値と交配親平均値との比較

果実形質における実生集団と交配親の平均値差の比較結果を表 5 に示す。収穫日について, 交雑集団で 2017 年および 2018 年の 2 年ともに交配親より遅いなど収穫日の日差が両集団とも見られたが有意差は確認できなかった。果実重において, 交雑集団で

表5 果実形質の集団別における交配親との関係性 (2017年, 2018年)

		2017年		2018年	
		交雑集団	自殖集団	交雑集団	自殖集団
収穫日	交配親との差	7.0	-4.1	5.8	2.6
	有意差	n.s	n.s	n.s	n.s
果実重 (g: 実数値)	交配親との差	83	-7	122	-106
	有意差	n.s	n.s	n.s	* *
果実重 (g: 対数値)	交配親との差	0.072	-0.022	0.097	-0.157
	有意差	n.s	n.s	n.s	* *
果皮色 (果梗部 : 1~6)	交配親との差	0.323	-0.320	-0.115	-1.257
	有意差	n.s	n.s	n.s	*
果皮色 (果頂部 : 1~6)	交配親との差	-0.223	-0.755	0.273	-0.029
	有意差	n.s	n.s	n.s	n.s
果肉色 (1~6)	交配親との差	-0.377	0.025	0.183	0.000
	有意差	n.s	n.s	n.s	n.s
果肉障害 発生度 (1~100)	交配親との差	-0.486	-2.375	7.833	4.286
	有意差	n.s	n.s	n.s	n.s
糖度 (° Brix)	交配親との差	1.229	1.203	0.412	0.694
	有意差	n.s	n.s	n.s	n.s

※検定はマンホイットニーのU検定。*は5%以下, **は1%以下で有意差あり, NSは有意差無し。

交配親より重く、自殖集団では交配親より軽くなった。特に自殖集団は2018年において「アーウィン」より106g有意に軽くなる結果となり標準偏差の影響を除外した対数値の結果も同様となった。果皮色において、2018年の自殖集団の果梗部で「アーウィン」より有意に色の変化が見られたがそれ以外においては交配親との差は1以下と軽微で有意差は確認できなかった。果肉色においても同様の傾向で交配親との差は確認できなかった。果肉障害発生度において、実生集団の方が交配親より2017年で値が低く2018年で値が高い結果となったが有意差は確認できなかった。糖度において、2017年で実生集団の方が交配親よりも糖度が1.2度程度高い結果となったが有意差は確認されず、2018年は交配親との差が軽微であった。

である個体出現率は2017年が10.0%(1個体/10個体)で2018年が0.0%(0個体/7個体)となった。果実重が400g以上で果肉障害発生度10未満の個体出現率は2017年および2018年ともに0.0%(2017年:0個体/10個体, 2018年:0個体/7個体)となった。果実重400g以上で糖度15度以上の個体出現率および選抜水準を全て超える個体出現率も0.0%であった。2017年および2018年ともに交雑集団の方が自殖集団よりも選抜水準を超える個体の出現率が高く、特に果実重が400g以上の個体出現率、果実重400g以上で果梗部の果皮色が赤色系(3.5以上)の個体出現率、果実重400g以上で糖度15度以上の個体出現率において集団間で有意差が確認された。

考 察

選抜水準を超える個体の出現率の比較

選抜水準(果実重400g以上を満たした上で果梗部の果皮色が赤色系(3.5以上)、果肉障害発生度10未満、糖度15度以上)を超える個体の出現率(選抜水準を超える個体数/全個体数)の集団別の結果を表6に示す。交雑集団において、果実重400g以上の個体出現率は2017年が83.3%(25個体/30個体)で2018年が90.0%(27個体/30個体)となった。果実重が400g以上で果梗部の果皮色が赤色系(3.5以上)の個体出現率は2017年が50.0%(15個体/30個体)で2018年が43.3%(13個体/30個体)となった。果実重が400g以上で果肉障害発生度10未満の個体出現率は2017年が33.3%(10個体/30個体)で2018年が26.7%(8個体/30個体)となった。果実重400g以上で糖度15度以上の個体出現率は2017年および2018年ともに60.0%(18個体/30個体)となった。選抜水準を全て超える個体出現率は2017年で23.3%(7個体/30個体)で2018年は13.3%(4個体/30個体)となった。自殖集団において、果実重400g以上の個体出現率は2017年が10.0%(1個体/10個体)で2018年が0.0%(0個体/7個体)となった。果実重が400g以上で果梗部の果皮色が赤色系(3.5以上)

集団別における果実形質比較の結果より、交雑集団では自殖集団に比べて収穫時期が1ヶ月ほど遅く、果実重が重くなり果肉障害発生度が高くなる事が2017年および2018年ともに確認され、2017年で果皮色の赤色が若干薄くなる結果となった。これら形質に集団別で違いが見られた要因は、交雑集団の片親である「キーツ」の品種特性である収穫期が晩生で果実重が大果、果皮色が緑色(石畑, 2000)、収穫が遅れると果肉崩壊などの障害が起こる特徴(米本, 2014)などの形質が交雑実生に遺伝した事で自殖集団との形質間差が見られたと考えられる。

果実形質の出現頻度分布の比較より、果実重および果肉障害発生度において交雑集団の方が自殖集団よりも分散値が有意に高かった。また、果実重では出現頻度が高い範囲の出現率が20%ほどとなり、「キーツ」以上の果実重である800~899gや1000g以上の個体の出現率が10%程度見られる等、出現頻度分布の傾斜が緩やかで幅の広い山型の形状となった。マンゴーは接ぎ木などで遺伝構成がそのまま複製・増殖される栄養繁殖性作物である。栄養繁殖性作物は、その成立過程で自殖を経過してないた

表6 集団別での選抜希望個体の出現率(2017年, 2018年)

		果実重400g以上を満たした個体		果実重400g以上で果皮色(果梗部)が赤色系を(3.5以上)満たした個体		果実重400g以上で果肉障害発生度10未満を満たした個体		果実重400g以上で糖度15度以上を満たした個体		選抜目標を全て満たした個体		
		個体数	出現率(%) 個体数/全個体数	個体数	出現率(%) 個体数/全個体数	個体数	出現率(%) 個体数/全個体数	個体数	出現率(%) 個体数/全個体数	個体数	出現率(%) 個体数/全個体数	
2017年	交雑集団	30	25	83.3	15	50.0	10	33.3	18	60.0	7	23.3
	自殖集団	10	1	10.0	1	10.0	1	10.0	0	0.0	0	0.0
	有意差		**		*		n.s		**		*	
2018年	交雑集団	30	27	90.0	13	43.3	8	26.7	18	60.0	4	13.3
	自殖集団	7	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	有意差		**		*		n.s		**		n.s	

※検定はカイ二乗検定。*は5%以下、**は1%以下で有意差あり、n.sは有意差なし。

め、遺伝子座がヘテロ接合体となっている事が多い。そのため、イネやトマトなど容易に自殖や近交系個体を獲得できる他作物とは異なり、後代一代目で親の特性は維持されずに遺伝的分離が見られる(池橋, 1996, 鶴飼, 2003)。特に、栄養系での品種間交雑は雑種第一代(以下, F_1)で多様な遺伝子型が分離されるため、その世代で選抜を開始する事が多い(池橋, 1996)。今回、集団別で果実重および果肉障害発生の出現頻度分布や分散値が異なる結果となったのは、果実重や果肉障害に関与する遺伝子座で交雑集団の方が自殖集団よりも遺伝的分離が多く見られた事によるものと考えられる。なお、収穫日、果皮色、果肉色、糖度は集団別で分散値に有意差が見られず正規分布を示す傾向であった事から、関連する遺伝子座が交雑集団と自殖集団どちらも同様に遺伝的分離が行われたと考えられる。

果実形質の集団平均値と交配親平均値の比較より、果実重において自殖集団が「アーウィン」よりも有意に軽い結果となったが、これは自殖弱勢が働いた事によるものと考えられる。自殖弱勢(近交弱勢)が生じる要因としていくつか説があるが(鶴飼, 2003)、近親交配を続けると遺伝子座の多くがヘテロ接合からホモ接合になる事によって、収量や樹勢などの生活力のような形質で見られる事が一般的に知られている。また、自殖などの極端な近親交配では、各遺伝子座のホモ化が急速に進み、有効な組み替えの起こる確率が著しく低下するとされている(藤巻, 2003)。今回の結果も、マンゴーの果実重における遺伝子座で極端なホモ化が進んで生じたものであると推察される。なお、収穫日、果皮色、果肉色、果肉障害発生日、糖度の果実重以外の項目においては自殖集団と「アーウィン」で有意差が見られない傾向であったため、これら果実形質は近親交配による形質劣化の減少が起きにくいと考えられる。なお、果実重において交雑集団が交配親よりも重くなったが、有意差は確認できなかった。本来、果実重などの量的形質に係る遺伝子座は相加効果(片親の遺伝子座の半分をもう片親の遺伝子座に置き換えた時の量的形質の変化量、両親の遺伝子型値の平均値で表される)と優性効果(片親の遺伝子座の半分をもう片親の遺伝子座に置き換えた時の対立遺伝子間の交互作用、 F_1 の遺伝子型値から両親

の遺伝子型値の平均値を引いた値で表される)の合計で表す事ができ(鶴飼, 2003)、遺伝効果が相加効果のみである場合、環境変化がなければ F_1 の平均値は両親の平均値に一致するが、優性効果が大きいと F_1 の平均値と両親の平均値の関係は緊密でなくなる(山田, 2011)。今回の「アーウィン」と「キーツ」の交雑集団における果実重の交配親との差で有意差が確認されるほどの顕著な増加が見られなかった要因は、「アーウィン」と「キーツ」の交雑が相加効果のみであるか、有意差の見られない程度の低い優性効果の組み合わせであった可能性が考えられる。

集団別における選抜水準を超える個体の出現率の比較より、交雑集団は自殖集団に比べて選抜水準を超える個体の出現率が高い事が分かった。これは先に述べたような果実重において交雑集団の方が自殖集団より遺伝分散が大きく、分布も広く緩やかであった事により、果実重400g以上の個体が多く作出されたためと考えられる。また、自殖集団においても、先に述べたように各遺伝子座のホモ接合化が急速に進む自殖弱勢によって遺伝分散が小さくなり、果実重400g以上の個体の発生が著しく低下した事により、選抜水準を超える個体の出現率が低くなったと考えられる(藤巻, 2003)。

以上より、マンゴーの交雑集団は自殖集団よりも栄養繁殖性作物としての遺伝的特徴によって果実重に関連する遺伝子座で多様な遺伝子型が分離する事で様々な形質を持つ個体が作出されるとともに、選抜水準を超える個体も多く作出できる育種的な利点がある事が分かった。また、自殖集団においてはマンゴーにおいても果実重において自殖弱勢が働く事で交配親よりも果実重が軽くなる現象が発生し、選抜水準を超える個体が著しく発生しづらい事も分かった。そのため、沖縄県におけるマンゴー育種においては自殖集団より交雑集団を用いるべきであると結論づけた。

果樹は先に述べたように他の作物育種と異なり、優良形質を持つ品種を両親として交雑した F_1 の中から優良個体を選抜し、接ぎ木などで増殖して品種とする育種方式が主流である。また、実生養成から結実した果実の形質を評価できるまでの期間が長い事に加え、植物体が大きいため育種で必要とされる圃場面積が大きい、交配から品種登録までの所要年

表7 集団別の葉形態(2018年10月31日~11月1日調査)

	調査個体数	葉長 (cm)	葉幅 (cm)	葉比率 (葉長/葉幅)
交雑集団	46	23.5	5.9	4.0
自殖集団	22	23.4	5.2	4.5
有意差		n.s	**	**

※交雑集団および自殖集団は一文字整枝法でのデータ。調査樹は7~8年樹。新枝中央部の成熟した葉を1個体3枚調査した。表中の**は1%以下で有意差あり、NSは有意差無し(t検定)。

数が15～30年近くかかるなどの特徴がある(鶴飼, 2003)。加えて、マンゴーでは花が小さく生理落果も多いため人工授粉が難しく、品種間交雑する際は閉鎖空間内で授粉昆虫を用いて交配を行わなければいけない(Pinto *et al.*,2002)。また、交雑確認を葉などの形態的特徴で判断しづらく、容易に自殖を苗養成の段階で除外する事も難しい。その事を確認するために、2018年10月31日から11月1日に「アーウィン」と「キーツ」交雑集団46個体と「アーウィン」自殖集団22個体において葉形調査を実施した。調査した葉は新梢中央部の成熟した葉の葉長および葉幅を1個体3枚ずつ測定した。その結果、葉の長さや葉比率で交雑集団と自殖集団で有意差が見られるものの、その差は葉幅で7mmと微小であり、形態学的方法で確実に交雑しているか判断する事は容易ではない事が分かった(表7)。さらに、本県のマンゴー栽培においては安定的に開花結実させるためには施設栽培での管理が必須であり、多くの実生個体を養成する事には制約がある。

以上のような果樹やマンゴー特有の育種課題を抱えた上で有望個体を作成する事を考えた場合、交配した実生集団に対して樹体養成の開始前に、DNAマーカー(Shudo *et al.*,2013,保坂ら, 2014)を用いて交雑しているか遺伝子レベルで確実に確認し、交雑実生を優先的に養成する行程は、マンゴー育種の選抜効率を高めるためには必要不可欠な流れであると考える。現在、本県ではそのような考えの上で、交雑集団の充実を行っている最中である。

また、名護支所が保存し交配素材として利用している海外導入品種は「ヘーデン」が片親である品種が多い(保坂ら, 2014)。今回供試した交雑集団の交配親についても、「アーウィン」は「リペンス」と「ヘーデン」の交配品種で片親の「リペンス」は「ヘーデン」の後代品種、「キーツ」は「ヘーデン」と「ブルックス」の交配品種であり(保坂ら, 2014, 米本, 2014)、「ヘーデン」由来の遺伝子を両親ともに持っている。カキでは完全甘ガキ品種群が互いに近縁関係である事によって(Yamada *et al.*, 1993; Yamada *et al.*,1994;Kanzaki *et al.*,2000)、近交係数が0の完全甘ガキ同士を交雑しても実生集団の果実重が小玉化するという報告があり(Yamada *et al.*,1994)、少数の品種どうしで交配をし続けると品種間交雑で近交係数が低くても近交弱勢が見られる事も多い。現在のマンゴー育種において、近親交配により得られた交雑実生で果実重の減少などの近交弱勢は確認できていない。しかし、マンゴーにおいても、品種間交雑が進むと交雑実生でも近交弱勢が生じる可能性はあるかもしれない。今後は、東南アジアやオーストラリアなど様々な地域の遺伝資源を収集し交配親となる品種の充実を図る取り組みも必

要になると考えられる。

謝 辞

本研究の推進にあたり、沖縄県農業研究センター名護支所果樹班の皆様のご協力をいただきまして心より感謝致します。また、本論文の作成にあたり、沖縄県農林水産総務課の正田守幸氏および日本大学の山田昌彦教授には本調査データに関する分析方法や本結果の考察に関して多大なるご助言をいただきまして心より感謝致します。本研究は「気候変動対応型果樹農業技術開発事業」および「沖縄県産業振興重点研究推進事業」の一課題として実施された。

引用文献

- Honsho,C., M. Inada, K. Yuji, M. Tojiki, S. Kurogi, S. Kanzaki , T. Tetsumura (2012) Efficiency of Hybrid Formation by Open-pollination of Two Cultivars in a Closed Plastic House and the Effect of the Male Parent on Fruit Characteristics in Mango.J. Japan. Soc. Hort. Sci. 81 (1) :27-34.
- 保坂ふみ子, 寺上伸吾, 西谷千佳子, 國久美由紀, 山本俊哉, 尾上佑子, 正田守幸 (2014), SSR マーカーによるマンゴー品種の同定と類縁関係の評価, 園芸学研究 13 (別 2), P388.
- 藤巻宏 (2003), 植物育種原理, 養賢堂, p106 ~ 111.
- 池橋宏, (1996), 植物の遺伝と育種, p168 ~ 169, 養賢堂
- 石畑清武 (2000), 熱帯果樹マンゴー栽培の新技術, p9, 欺文堂株式会社
- 鹿児島県, ハウス栽培マンゴーの成木の樹形改造による低樹高・省力化 (2004), 平成 16 年度普及に移す技術, 鹿児島県農政部
- Kanzaki,S., K. Yonemori, A. Sato, M. Yamada and A. Sugiura (2000) Analysis of genetic relationships among pollination-constant and non-astringent (PCNA) cultivars of persimmon (*diospyros kaki thumb.*) from Japan and China using amplified fragment length polymorphism (AFLP) .J.Japan.Soc.Hort.Sci.69:665-670.
- 菊池香, 平良英三, 中村哲也 (2011), 沖縄におけるマンゴー産地の課題と展望, 農林統計出版, p138 ~ 141.
- Lavi,U.,E.Tomer and S.Gazit (1989) Inheritance of agriculturally important traits in mango, *Euphytica* 44 : 5-10.
- Lyrene,P., (1983) Inbreeding depression in rabbiteye blueberries,*HortScience* 18:226 ~ 227.
- 仲村昌剛, 松村まさと, 與儀喜代政 (2018), 農研センター名護支所保存のマンゴー海外導入品種の果実特性の把握および安定着果性を有した高品質な育種素材の探索, 沖縄農業研究会第 57 回 (平成 30 年度) 大会

- 講演要旨・総会資料, p3 ~ 4,
- 農林水産省 (2018年8月閲覧), 農林水産植物種別審査基準「マンゴー種 特性表」(<http://www.hinshu2.maff.go.jp/info/sinsakijun/kijun/1401.pdf>)
- 沖縄県 (2007), 平成18年度種苗特性分類調査報告書「マンゴー」
- 沖縄県 (2011), 沖縄県果樹栽培要領 (平成23年12月版), p139 ~ p146, 沖縄県農林水産部
- 沖縄県 (2018), 農業関係統計 (平成30年3月版), p66, 沖縄県農林水産部
- Pinto ACQ, Andrade SRM, Ramos VH, Cordeiro MCR (2002) Intervarietal hybridization in mango (*Mangifera indica* L.) : techniques, main results and their limitations. *Acta Horti* 645:327-330.
- Ravishankar, K. V., B. H. R. Mani, L. Anand and M. R. Dinesh. (2011) Development of new microsatellite markers from Mango (*Mangifera indica*) and cross-species amplification. *Am. J. Bot.*, 98 (4) : e96-e99.
- SCHNELL. R. J., C. T. OLANO, W. E. QUINTANILLA, A. W. MEEROW, (2005) Isolation and characterization of 15 microsatellite loci from mango (*Mangifera indica* L.) and cross-species amplification in closely related taxa, *Molecular Ecology Notes*, 5, 625-627.
- Sato A., Y. Sawamura, N. Takada and T. Hirabayashi (2008) Relationship between inbreeding coefficients and plant height of 1-year-old seedlings in crosses among Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) cultivar/selections. *Scientia Horticulturae* 117:85-88.
- 首藤亜耶乃, 浦崎直也, 太郎良和彦, 照屋和則 (2012), DNA マーカーによるマンゴーの品種識別と他殖個体判定技術, 平成24年度普及に移す技術の概要, 沖縄県農林水産部
- Shudo. A., K. Tarora, Y. Makishi, R. Ichi, K. Takahashi, M. Matsumura, S. Shimabukuro, N. Matsuda, et al, (2013) Development of CAPS markers and their application in breeding for mango, *Mangifera indica* L. *Euphytica* (2013) 190:345-355.
- 澤岬哲也, 與儀喜代政, 仲村昌剛, 松村まさと (2018), 簡易病原性検定法によるマンゴー遺伝資源の炭疽病抵抗性評価, 平成30年度普及に移す技術の概要, 沖縄県農林水産部
- 鶴飼保雄 (2003), 植物育種学, p107, p155, p196, p199 ~ 203, 東京大学出版会
- Viruel, M. A., P. Escibano, M. Barbieri, M. Ferri, J. I. Hormaza, (2005) Fingerprinting, embryo type and geographic differentiation in mango (*Mangifera indica* L., Anacardiaceae) with microsatellites, *Molecular Breeding*, 15 : 383-393
- Yamada, M., (1993) Persimmon breeding in Japan, *JARQ* 27,33-37.
- Yamada, M., H. Yamane and Y. Ukai (1994) Genetic analysis of Japanese persimmon fruit weight,
- 山田昌彦 (2011), 果樹の交雑育種法, p256, 養賢堂
- J. Amer. Soc. Hort. Sci. 119 (6) : 1298-1302.
- 米本仁巳 (2014), 最新農業技術 vol.7 ブドウ「シャインマスカット」と熱帯特産果樹, p172, 農山漁村文化協会
- 米本仁巳 (2016), 新特産シリーズ「マンゴー」完熟果樹栽培の実際, p34 ~ p42, p126, 農文協

To compare fruit traits in crossed seedling groups of "Irwin" and "Keitt" and a self-pollination group of "Irwin"

Masataka Nakamura¹, Masato Matsumura¹, Kiyomasa Yogi², Yuko Onoue (Makishi)³,
Humiko Hosaka⁴, Toshiya Yamamoto⁴

1 Okinawa Prefectural Agricultural Research Center Nago Branch

2 Okinawa Prefectural Agricultural Research Center

3 Retired

4 Institute of Fruit Tree and Tea Science, NARO

Abstract

In order to ascertain the usefulness of crossed seedlings and self-pollination in breeding selection, we compared the fruit traits and occurrence of frequency distributions in determining the appearance rate of selected individuals in the crossed seedling group of "Irwin" and "Keitt" (hereafter termed the "crossed groups") and the self-pollination group "Irwin" (hereafter termed the "self-pollination group"). As a result of comparing the fruit traits, the harvest date was later, fruit weight became heavier, fruit disorder occurrence was higher, and skin color red was slightly thinner in the crossing groups than the self-pollination group. There was no significant difference in sugar content or pulp color between the populations. The frequency distribution of fruit traits, including fruit weight and fruit disorder occurrence, in the crossing groups had higher variance than in the self-pollination group, which led to a mountain-shaped graph. Comparing the population mean value of the fruit traits with the cross-parent mean value, the fruit weight of the self-pollination group was advantageously lighter than "Irwin". The appearance rate in selected individuals (individuals with a fruit weight of 400 g or more, sugar content (°Brix) of 15 degrees or more, skin color of the stalk side becomes red, flesh disorder incidence of less than 10) was higher in the crossing groups than in the self-pollination group.

As a result of the above findings, it was found that the crossing groups had a breeding advantage that many genotypes are isolated at the genetic locus related to fruit weight rather than the self-pollination group and many individuals can be created that satisfy selection goals. In addition, similar to other fruit trees, it was found that inbreeding depression affects fruits weight even in mango. Therefore, we concluded that the crossing groups should be compared with the self-pollination group in mango breeding in Okinawa Prefecture.

Keywords: breeding, fruit weight, DNA marker, interbreed crossing, inbreeding depression

***Neofusicoccum parvum* によるマンゴー軸腐病（病原追加）**

澤岬哲也・安次富 厚・新崎千江美・大城 篤・佐藤豊三

2012年頃から沖縄県において、収穫後のマンゴー果実（品種：リペンス）で果梗部から軟化・腐敗する症状が発生して問題となっている。罹病果実より分離された病原菌は、形態、培養特性および rDNA-ITS、EF1- α 遺伝子領域の塩基配列の相同性に基づき、*Neofusicoccum parvum* と同定された。分離菌の接種試験により、マンゴー果実で原病徴が再現され、果実病斑からは接種菌が再分離された。我が国では本種を病原とする記録はないことから、マンゴー軸腐病の病原に *N. parvum* を追加することを提案する。

出典：日植病報 83：102-106（2017）

“ミニディスペンサー”を土壤表面に施用する交信かく乱法による ケブカアカチャコガネの防除

新垣則雄

信越化学工業（株）が考案した生分解性のプラスチックで作製した小さなディスペンサー（ミニディスペンサー：長さ 2cm、外径 2.2mm）をサトウキビの株元に均等に処理する交信かく乱法で害虫のケブカアカチャコガネを防除できるかどうかを宮古島の複数のサトウキビ畑（800 m²）で 2012 年の 2 月に検討した。対照として通常のロープ型ディスペンサーによる交信かく乱法と比較した。その結果、無処理区においてはほとんどの雌成虫が交尾していた（95%）が、ミニディスペンサーとロープ型ディスペンサーの処理区ではほとんどの雌は交尾してなく、無処理区と比べて有意に交尾率が低下していた。ミニディスペンサーの処理密度が増加するに伴い交尾率が低下した。ミニディスペンサーの 4,000 個処理はロープ型ディスペンサー処理とほぼ同程度の交尾率であった。トラップによる雄成虫の相対捕獲率では処理区は無処理区に比べて有意に捕獲数の減少が認められ、ミニディスペンサー処理区とロープ型ディスペンサー処理区はほぼ同程度であった。ミニディスペンサーを用いれば高い防除効果が得られるだけでなく、フェロモンとプラスチック樹脂の両方を従来の処理に比べて大幅（10%、16%）に節約できることが示された。

出典：植物防疫 71（8）：507-511（2017）

沖縄県宮古島におけるイネヨトウ（チョウ目：ヤガ科）とカンシャシンクイ（チョウ目：ハマキガ科）によるサトウキビ芯枯れ被害およびその対策

清水 優子・又吉 祐輔・友利 研一・山口 綾子・上里 卓己

沖縄県宮古島におけるサトウキビの夏植えおよび株出し圃場のイネヨトウとカンシャシンクイによる芯枯れ被害について調査した。芯枯れ茎はほとんどが両種の食害によると考えられ、夏植え圃場では秋から冬にかけて徐々に芯枯れ茎率が増加し、株出し圃場では春にピークがあった。島内の3か所または1か所に設置した性フェロモントラップでの誘殺数はイネヨトウでは明瞭なピークが見られず、カンシャシンクイでは春に大きなピークと夏期に極端な減少が見られた。イネヨトウの芯枯れ茎率と産卵推定時期の誘殺数は、夏植え時の粒剤による防除効果が持続している期間を除いて解析すると有意な相関が認められ、誘殺数から被害を予測できる可能性が示唆された。植付時の薬剤処理としてフィプロニルベイト剤が芯枯れに対して効果が高かった。分けつ期のクロラントラニリプロール水和剤の散布は効果的に芯枯れ茎を抑制した。株出し時の粒剤処理は、フィプロニルベイト剤およびベンフラカルブ粒剤の2剤と、株出し管理機で作られた溝への散粒および土壌混和处理の2処理のいずれの組み合わせも効果に差はなかった。これらの結果から、サトウキビの植付時にフィプロニルベイト剤、分けつ期にクロラントラニリプロール水和剤を処理することでイネヨトウおよびカンシャシンクイによる芯枯れ被害を効果的に抑制できること、株出し栽培ではより安価な農薬を利用できることが示唆された。

出典：日本応用動物昆虫学会誌 62 (1) : 55-65 (2018)

香気を強化した黒糖の製造技術開発

広瀬直人・前田剛希・照屋亮・高良健作・和田浩二

黒糖製造工程の仕上工程に相当するサトウキビシラップ温度が 105～130℃の濃縮過程で発生する蒸気から、黒糖の香り成分液が得られた。香り成分液は、ピラジン類をはじめとする様々なメイラード反応生成物を含んでいた。黒糖の香気を強化するために、香り成分液を黒糖の最終仕上工程前のシラップに加えた。その結果、香気を強化した黒糖は、製造後8週目においても、製造直後の通常黒糖よりも強い匂い強度を有していた。

出典：沖縄農業 49:11-19 (2018)

果実の追熟程度や pH 調整がマンゴー ‘アーウィン’ のペースト品質に及ぼす影響

広瀬直人・前田剛希・恩田 聡・伊礼彩夏・島尻庸平・菅原晃美

‘アーウィン’種のマンゴーを用いたペースト製造において、適切に追熟させた食べ頃の果実を用いると、カロテノイドを多く含有し、色や香りおよび食味に優れたペーストを製造することができた。未追熟の果実を用いると、糖酸比が低く、カロテノイド含有量が少なく、香りも悪くなることから、ペースト製造の原料には適さなかった。また、過熟の果実を用いると、色調は良いが、香りが悪くなった。ペーストを pH4.0 未満に調整することで温和な条件での加熱殺菌が可能となり、アルコール類やアルデヒド類の香気成分を多く含有し、良好な色合いのペーストが製造できたが、糖酸比が低いことから加工用途に適する。

出典：沖縄農業 49:3-9 (2018)

肥効調節型肥料を利用したオクラ春植え栽培の省力施肥 ～性質の異なる 3 土壌の適正施肥量について～

田中洋貴

オクラ栽培は追肥回数が多く、生産現場で省力化が求められている。そのため肥効調節型肥料の開発と県内 3 土壌における施用基準を検討した。その結果、慣行の「尿素入り複合磷加安 804 号 (18 - 10 - 14)」の分施肥系 (28Nkg/10a) に対して、肥効調節型肥料 (18 - 10 - 14、N 緩効率 80%、LPS80 : LPS140=35 : 65) を、ジャーガルで 20Nkg/10a、島尻マーヅで 28Nkg/10a、国頭マーヅで 28Nkg/10a を全量基肥することより追肥を省略することが可能となった。

出典：グリーンレポート 583 : 14-15 (2018)