

カンキツの三倍体無核性品種の育成に関する研究

—とくに $2x-4x-4x$ 倍数性キメラの利用と倍数性判定の効率化について—

2018

柳本 裕子

目次

緒言	1
第1章 コルヒチン処理による四倍体および $2x-4x-4x$ 倍数性キメラ 個体の作出	5
第1節 コルヒチン処理による倍数体の作出	5
第2節 倍数性キメラの組織別倍数性	6
第3節 考察	8
第4節 摘要	9
第2章 コルヒチン処理により作出した四倍体および $2x-4x-4x$ 倍数 性キメラの葉，花および果実の形態的特性	15
第1節 四倍体および $2x-4x-4x$ 倍数性キメラの葉の形態的特性	15
第2節 四倍体および $2x-4x-4x$ 倍数性キメラの花の形態的特性	16
第3節 四倍体および $2x-4x-4x$ 倍数性キメラの果実の形態的特性	17
第4節 考察	18
第5節 摘要	20
第3章 コルヒチン処理により作出した $2x-4x-4x$ 倍数性キメラの三 倍体育種親としての有効性	33
第1節 $2x-4x-4x$ 倍数性キメラの種子親としての有効性	33
第2節 $2x-4x-4x$ 倍数性キメラの花粉親としての有効性	34
第3節 考察	35
第4節 摘要	36

第 4 章 成熟種子に残存する胚乳の倍数性に基づく胚および配偶子の倍数性推定	40
第 1 節 自然交雑で得られた完全種子の組織別倍数性	41
第 2 節 ‘大橘’の自然交雑で得られた完全種子組織の発育過程における倍数性検出の変化	42
第 3 節 内種皮の倍数性に基づく交雑実生の倍数性の推定と検証	43
第 4 節 考察	45
第 5 節 摘要	49
第 5 章 $2x-4x-4x$ 倍数性キメラを交配親として育成した三倍体新品種 ‘黄宝’の特性	58
第 1 節 育成過程	58
第 2 節 ‘黄宝’の特性	59
第 3 節 考察	61
第 4 節 摘要	62
第 6 章 総合考察	67
第 7 章 総摘要	71
引用文献	73
謝辞	78

緒言

カンキツ類は，年間果実総生産量が約 1 億 4 千 6 百万 t (FAOSTAT,2016,<http://faostat.fao.org/>) で，世界で最も多く栽培されている果樹であり，生食用をはじめ加工品や，機能性成分に着目した医薬品，洗剤類などに幅広く利用されている．特に生食用，加工用に利用される品種では，食べ易さ，扱い易さから，無核性は重要な形質であり，主要な育種目標となっている．

カンキツ類における無核性品種の育成手法には，ウンシュウミカンに由来する雄性不稔性の利用，放射線照射などの人為的突然変異の誘発，三倍体の利用，無核紀州型無核性の利用などがある．このうち三倍体は，幼苗期の判定が可能で無核率が高い上，受粉しても種子が入りにくいため，無核性品種の育成に多く利用され，新品种が登録されている (Cuenca ら，2010；金好ら，2014；中島ら，2015；Recupero ら，2007，2008；Soost・Cameron，1980，1985；徳永ら，2005)．三倍体は，主に四倍体を用いた交雑によって得られるため，四倍体は非常に重要な育種素材である．また，二倍性細胞と四倍性細胞が混在する倍数性キメラ（以下，倍数性キメラとする）のうち，茎頂分裂組織第一層（以下，L1）が二倍性，第二層（以下，L2）および第三層（以下，L3）が四倍性である倍数性周縁キメラ（以下，2x-4x-4x 倍数性キメラ）も，四倍体と同様に三倍体を育成するための交配親として活用できることが報告されている（金好・山口，2002；糠谷ら，2011）．四倍体は，多胚性品種では，珠心組織から無性的に発生する珠心胚実生において，染色体の自然倍加により出現することが報告されている (Barrett and Hutchison, 1987；Frost, 1925；河瀬ら，2005；Longley, 1926；生山，1992)．また，種子へのコルヒチン処理あるいはオリザリン処理による珠心胚実生の染色体倍加が報告されている（八幡ら，2004）．一方，単胚性品種における四倍体は，人為的な作出の報告のみであり，腋芽のコルヒチン処

理により得られたことが報告されている (Aleza ら, 2009; 金好ら, 2008; 生山, 1992). しかし, 四倍体の育種素材は限られており, 特に単胚性品種は少ない. 三倍体を利用した育種を計画的に展開するには, 育種目標に沿った遺伝形質を有する四倍体を作成しておく必要がある. また, コルヒチン処理では, 四倍体が獲得できる品種がある一方で, 倍数性キメラ個体しか獲得できない品種がある (金好, 2008). この倍数性キメラを三倍体の交配親として利用するには, 花粉や胚のうの起源層である L2 が四倍性の個体を選抜する必要がある. 倍数性の判定には, 染色体の観察や (生山ら, 1981) フローサイトメトリーによる解析 (春崎ら, 2000; 上曾山ら, 2000) などの方法がある. このうちフローサイトメトリーによる解析では, 葉および果実における多様な組織で倍数性が判定できることが報告されている (春崎ら, 2000; 上曾山ら, 2000). そこで, 本研究の第 1 章では, 単胚性品種を中心に, コルヒチン処理による四倍体および倍数性キメラ個体の作出を行った. このうち, 倍数性キメラについては, 葉組織, 果実組織および花粉の倍数性を調査して, 四倍体と同様に三倍体育成の交配親として利用できる $2x-4x-4x$ 倍数性キメラであることを明らかにした.

上述のように, 倍数性調査にフローサイトメトリーによる解析は欠かせないが, 腋芽へのコルヒチン処理により四倍体が得られる確率は, 0.4% (金好ら, 2008) から 5.6% (生山, 1992), 倍数性キメラが得られる確率は 0.6% (金好ら, 2008) と低い. そのため, 四倍体や $2x-4x-4x$ 倍数性キメラを確保するには, 多数の腋芽にコルヒチン処理して育苗を行い, これらの倍数性の判定を行う必要があり, 多大な労力と費用が必要となる. そこで, 染色体倍加に伴う形態的特性を利用してコルヒチン処理個体群から四倍体あるいは $2x-4x-4x$ 倍数性キメラを粗選抜できれば, フローサイトメトリーによる解析を大幅に効率化できる. カンキツ属の四倍体の形態特性については, 生山 (1992) がハッサク, ヒュウガナツおよびクレメンティンで, キンカン属の四倍体および $2x-4x-4x$ 倍数性キメラの形態的特性に

については，安田ら（2008），糠谷ら（2011）がニンポウキンカンで報告しているが，その他の品種では明らかになっていない．そこで，第2章では，第1章で作出した20品種について，染色体倍加に伴う葉，花および果実の形態的特性を調査し，二倍体との形態的特性の差異によって，コルヒチン処理個体群から四倍体および2x-4x-4x倍数性キメラを粗選抜できる方法を明らかにした．

2x-4x-4x倍数性キメラの交配親としての有効性については，ニンポウキンカンの報告（糠谷ら，2011）などがあるが，その研究事例は少ない．そこで，第3章では，2x-4x-4x倍数性キメラ6品種について，種子親あるいは花粉親とした交配を行い，三倍体育成の交配親としての有効性を明らかにした．

カンキツ類における，無核性品種開発のための三倍体育成を目的とした交雑育種では，三倍体以外の倍数性を示す実生が得られることがある．二倍体×四倍体では，三倍体以外にも二倍体，四倍体（金好ら，1997；立川ら，1961）および六倍体が出現することがあり（Esen・Soost, 1972, 1973；生山，1992；八幡ら，2003），四倍体×二倍体では，多胚性品種を種子親とすると，三倍体と四倍体が混在して出現し（Esenら，1978；生山，1992；立川ら，1961；八幡ら，2003），単胚性品種を種子親としても三倍体以外に五倍体が出現する報告がある（Alezaら，2012；金好ら，2008）．そのため，交雑により得られた実生は，倍数性の確認が必要である．実生の倍数性確認は，交雑によって得られた種子を播種し，発根直後における根端細胞の染色体の観察（生山，1981）や，育苗した実生葉等のフローサイトメトリーによる解析（春崎ら，2000；上曾山ら，2000）で判定している．しかし，染色体の観察には多大な労力を要し，フローサイトメトリーによる解析が可能となるまでの育成期間中に育苗スペースの確保や管理労力，および分析費用を要する．倍数性育種を効率的に行うには，早期に簡易に，倍数性を判定できる方法が必要である．一方，成熟果実の種子組織の倍数性調査の中で，胚が二倍体の場合，内種皮は胚乳と同じ三倍体を示し，従来，退化して消滅す

ると考えられていた胚乳は種子中に存在している可能性が示唆された。そこで、第4章では、この要因を解明するため、種子の発育過程における組織構造の変化を明らかにした。また、それにより、胚乳組織は成熟種子に残存し、この胚乳の倍数性からその交雑実生の倍数性、さらに実生を形成した雌性および雄性配偶子の倍数性を推定できることを明らかにした。

以上のように、無核性品種の育成を目的とした三倍体作出において、主に倍数体選抜の効率化に関する研究を進めるとともに、作出した倍数体を利用して三倍体新品種の開発を行った。広島県では、原産であるハッサクおよび‘安政柑’などブンタンに由来する品種が特産品として栽培されている。しかし、種子が多く、果皮やじょうのう膜が硬く食べにくい形質のため、消費の低迷が続いている。そこで、これらの改良として、無核で剥皮し易いブンタン由来の品種育成を目的とした。第5章では、二倍体‘大橘’とコルヒチン処理によって作出した $2x-4x-4x$ 倍数性キメラ‘不知火’の交配から得られた三倍体において、果実品質が優れた系統を選抜し、その特性を明らかにして三倍体新品種‘黄宝’を育成した。

第 1 章 コルヒチン処理による四倍体および 2x-4x-4x 倍数性キメラ 個体の作出

カンキツ類の無核性品種の育成法の一つに三倍体の利用がある。三倍体は、主に二倍体と四倍体の正逆交雑から得られるので、四倍体は重要な育種素材である。四倍体は、多胚性品種では珠心胚実生から出現することがあるが、単胚性品種では主にコルヒチン処理などの人為的方法で作出されている。ここでは、多様な育種親を得るため、単胚性品種を中心にコルヒチン処理を行い、倍数体の獲得状況について明らかにした。また、コルヒチン処理では、四倍体とともに二倍性細胞と四倍性細胞が混在する倍数性キメラも得られる。この倍数性キメラのうち、花粉および胚のうの起源層である L2 が四倍性であるものは、四倍体と同様に三倍体育成の交配親として活用できることが報告されている（金好・山口，2002）。そこで、コルヒチン処理によって作出した倍数性キメラについて、組織別倍数性を調査し、L2 が四倍性の倍数性キメラを選抜した。

第 1 節 コルヒチン処理による倍数体の作出

材料および方法

1994 年より、広島県立総合技術研究所農業技術センター（広島県東広島市八本松町）にて、第 1-1 表の単胚性 13 品種、多胚性 7 品種について、生山の方法（1992）を一部改変したコルヒチン処理（金好ら，2008）を行った。すなわち、新梢伸長が停止して硬化した当年春枝を各年の 6～8 月に採取し、腋芽を 1～2 mm 大に切り取り、25℃の恒温器内で 0.1% のコルヒチン溶液に 2 時間浸漬し、処理した腋芽をカラタチに接木した（第 1-1 図）。2～3 ヶ月後に、達観で葉が厚い等の染色体倍加の可能性がある特徴（生山，1992）で選抜し、倍数性が安定するとされる 1 年 6 か月以上の間（古田ら，2004）ガラス室で育苗した後、倍数性を判定した。判定には、当年春枝の硬化した中位葉を用い、中央脈および側脈を除いた葉身中央部を 5

mm 角に切り出し，シャーレ上で，4', 6-Diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride（以下，DAPI）を $2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 添加した核単離液（Tris 塩酸：10 mM，Sodium Citrate：50 mM， MgCl_2 ：2 mM，Polyvinylpyrrolidone K-30：1%，Triton X-100：0.1%，pH7.5 の混合液）を 2 mL 加え，カミソリで 10～20 回粗く刻み，30 μm メッシュのフィルターでろ過してフローサイトメトリー（Ploidy Analyzer PA, Partec 社）により倍数性を解析した．

結果

第 1-1 表の 20 品種を用いて，7746 個の腋芽をコルヒチン処理し，茎頂接ぎ木を行った結果，2210 個の腋芽が伸長した（第 1-2 表）．これらを 1 年 6 か月以上育苗し，達観で葉が厚いと判定した 293 個体を選抜し，これらの葉の中央脈および側脈を除いた葉身中央部の倍数性をフローサイトメトリーで解析した（第 1-2 図）．その結果，15 品種の 139 個体が二倍性細胞のみを検出し，二倍体であった．四倍性細胞のみを検出し，四倍体と確認された個体は，14 品種の 65 個体で，その獲得率は品種によって異なり，0～6.3%であった．二倍性細胞と四倍性細胞が混在した倍数性キメラは，17 品種の 85 個体で，獲得率は 0～6.3%であった．

第 2 節 倍数性キメラの組織別倍数性

材料および方法

第 1 節で作出した四倍体および倍数性キメラは，生育良好な個体を選抜して 45～60 L ポットに移植し，各品種の二倍体とともに，同センター果樹研究部（東広島市安芸津町）の無加温ガラス室にて，1 品種当たり 1～2 個体ずつ育成した（第 1-3 図）．処理から 5 年以上経過した 2000～2012 年に，14 品種の倍数性キメラについて，樹冠全体から均等に，硬化した当年春枝 10 本を選定し，それぞれ葉 1 枚，果実 1 個を採取した．葉は，中央脈と側脈を除いた葉身中央部および中央脈中央部の維管束を 5mm 角の大きさに切り出して，第 1

章第 1 節と同様の方法で倍数性を測定した。果実は、表皮を含む 2～3mm の厚さの果皮，表皮を含まないフラベドとアルベド，じょうのう膜，さじょうの組織別に分け，それぞれ 5mm 角に切り出して，葉と同様の方法で判定した。花は，4～5 月に開花直前の花蕾を樹冠全体から均等に 5～10 花採取し，25℃ 10 時間日長に設定した人工気象室内で開葯した花粉を－30℃で冷凍保存し，3 か月後に解凍して供試した。フロストスライドガラスのスリ面上に 3～5 個の葯を置き，DAPI 添加核単離液 0.1 mL を加えて葯から花粉を取り出し，他のフロストスライドガラスのスリ面で花粉をすり潰した。さらに DAPI 添加核単離液 1 mL を加えて 30 μm メッシュのフィルターでろ過し，フローサイトメトリーにより倍数性を解析した。

結果

コルヒチン処理から 5 年以上経過した倍数性キメラの葉は，調査した 14 品種すべてで，中央脈および側脈を除いた葉身中央部が二倍性細胞と四倍性細胞が混在していた。また，中央脈中央部の維管束の倍数性は，調査した 11 品種すべてで四倍性であった（第 1-3 表）。花粉において，二倍体が半数性と二倍性のピークを示すのに対し，倍数性キメラ‘安政柑’[*Citrus maxima* (Burm.) Merr.]，‘土佐文旦’[*C. maxima* (Burm.) Merr.]，‘農間紅八朔’[*C. hassak hort. ex Tanaka*]，‘はるか’[*C. sp.* (hybrids)] および‘不知火’[(*C. unshiu* Marcow. × *C. sinensis* (L.) Osbeck) × *C. reticulata* Blanco] は，四倍体と同様に，二倍性と四倍性のピークを示した（第 1-3 表，第 1-4 図）。果実組織の倍数性において，二倍体は，表皮を含む果皮，表皮を含まないフラベドとアルベド，じょうのう膜および砂じょうのいずれも二倍性を示し，四倍体はいずれの組織も四倍性を示すのに対し，倍数性キメラ個体は，表皮を含む果皮，じょうのう膜およびさじょうで二倍性と四倍性，表皮を含まないフラベドとアルベドは四倍性のみを示した（第 1-3 表，第 1-5 図）。

第 3 節 考察

カンキツ類の三倍体を利用した無核性品種の育成を進めるには、育種親として、四倍体あるいは花粉および胚のうが四倍性である倍数性キメラの作出が重要である。本研究では、コルヒチン処理と茎頂接ぎ木の併用により、14 品種 65 個体の四倍体と、17 品種 85 個体の倍数性キメラが得られた。獲得率は、0～6.3%で品種によって差があり、‘土佐文旦’および‘はれひめ’[$((C.unshiu \text{ Marcow.} \times C.sinensis (L.) \text{ Osbeck}) \times (C.clementina \text{ hort.ex Tanaka} \times (C.paradisi \text{ Macfadyen} \times C.tangerina \text{ hort. ex Tanaka}))) \times C.unshiu \text{ Marcow.}]$ で四倍体および倍数性キメラの両方の獲得率が高く、‘安政柑’，‘不知火’，‘はるみ’[$(C.unshiu \text{ Marcow.} \times C.sinensis (L.) \text{ Osbeck}) \times C.reticulata \text{ Blanco}]$ ，‘安芸まりん’[$(C.unshiu \text{ Marcow.} \times C.sinensis (L.) \text{ Osbeck}) \times ((C.unshiu \text{ Marcow.} \times C.nobilis \text{ Lour.}) \times (C.clementina \text{ hort.ex Tanaka} \times (C.paradisi \text{ Macfad.} \times C.tangerina \text{ hort. ex Tanaka})))$], ‘あまつづみ’[$(C.unshiu \text{ Marcow.} \times C.sinensis (L.) \text{ Osbeck}) \times ((C.unshiu \text{ Marcow.} \times C.nobilis \text{ Lour.}) \times (C.clementina \text{ hort. ex Tanaka} \times (C.paradisi \text{ Macfad.} \times C.tangerina \text{ hort. ex Tanaka})))$]] および‘大津四号’[$C.unshiu \text{ Marcow.}]$ では四倍体を得られなかった。このように、本研究では、コルヒチン処理で倍数性キメラしか得られない品種が全体の 30%あったが、この倍数性キメラも交配親に利用できれば、育種素材の幅を広げることができる。Sugawara ら (2002) は、‘ハムリンオレンジ’とウンシュミカンの接木キメラの DNA 解析を行い、表皮系、じょうのう膜および砂じょうの一部が L1 由来、表皮を除いた葉の大部分、花粉や胚のう、表皮を除いた果皮のフラベドおよびアルベドの一部、じょうのう膜およびさじょうの一部が L2 由来、茎や葉脈の髄と、果皮のアルベドの一部が L3 由来の組織であると推定した。本研究で供試したカンキツ属 14 品種の倍数性キメラでは、葉組織の倍数性において、葉身は二倍性と四倍性の混在、維管束は四倍性、花粉の倍数性は、二倍性と四倍性、果実組織の倍数性において、表皮を含む果皮は二倍性と四倍性の混在、表皮を含

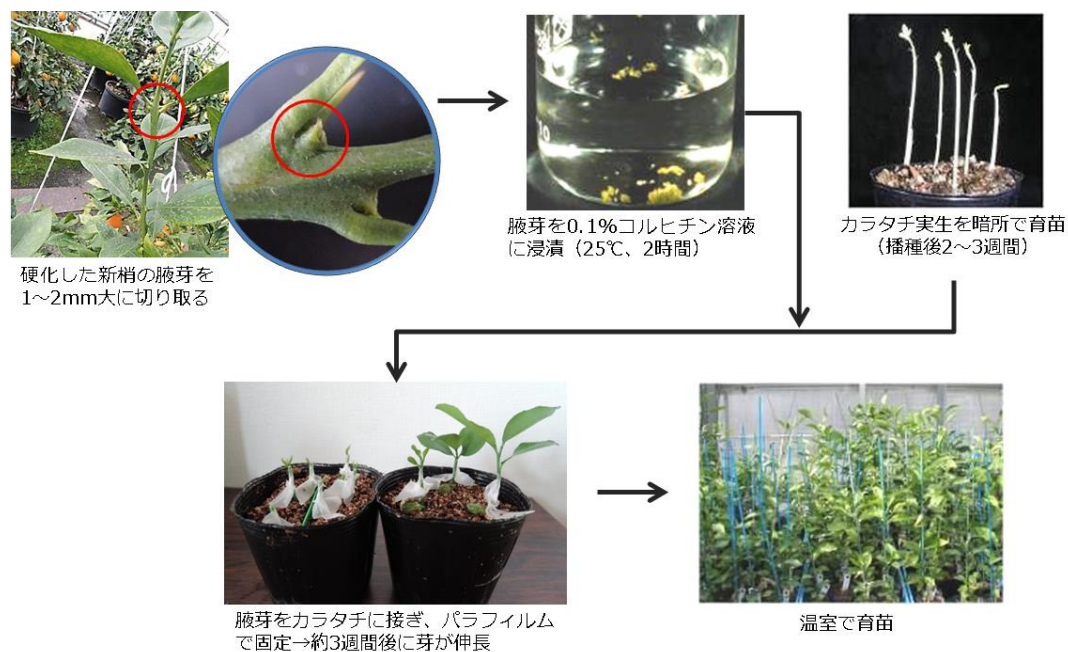
まないフラベドとアルベドは四倍性のみ，じょうのう膜およびさじょうは二倍性と四倍性の混在を示したことから，Sugawara ら（2002）の分類により，これらの倍数性キメラはいずれも L1 が二倍性，L2 および L3 が四倍性の 2x-4x-4x 倍数性キメラであることが示唆された．本研究において，花粉の倍数性においては，フローサイトメトリーによる分析で，二倍体の花粉が半数性と二倍性，四倍体および 2x-4x-4x 倍数性キメラの花粉が二倍性と四倍性を示した．一般に，カンキツ類などの二核性花粉は，開葯した時点は生殖細胞と栄養細胞の 2 細胞であるが，花粉が発芽すると，花粉管中で生殖細胞が 2 つの精細胞になる．この開葯後における生殖細胞が 2 つの精細胞に分裂する直前の段階では，生殖細胞中の生殖核は DNA の複製を終えており，DNA 量は二倍になっている（岩波，1980）．二核性花粉であるユリ（van Tuyt ら，1989）やシクラメン（高村・吉村，2007）では，フローサイトメトリーによる解析で，栄養核（後の花粉管核）の倍数性と，核数が二倍量となった生殖核の倍数性が現れることが明らかになっており，本報告でも同様の分析結果が得られた．また，2x-4x-4x 倍数性キメラの花粉が四倍体と同様の倍数性を示したことから，三倍体育成の花粉親として活用できることが示唆された．これまでに，花粉のフローサイトメトリーによる倍数性分析は，ユリ（van Tuyt ら，1989）やシクラメン（高村・吉村，2007）などで報告されている．本研究により，カンキツにおいても，花粉の多い品種ではフローサイトメトリーによる倍数性の分析が可能であることが明らかとなった．

以上のとおり，本研究で，コルヒチン処理によって作出した倍数性キメラは 2x-4x-4x 倍数性キメラであり，四倍体と同様に三倍体育成の交配親として活用できる可能性が示唆された．

第 4 節 摘要

腋芽のコルヒチン処理により，四倍体 14 品種，倍数性キメラ 17 品種を作出した．これらが出現する確率は品種によって異なり，とも

に 0.0～6.3% であった． コルヒチン処理後 5 年以上経過した生育良好な 14 品種の倍数性キメラの果実の組織別の倍数性を調査した結果， 四倍体はすべての組織で四倍性を示すのに対し， 倍数性キメラは表皮を含む果皮， じょうのう膜， さじょうで二倍性と四倍性の混在， 表皮を含まないフラベドとアルベドで四倍性のみを示した． さらに花粉の倍数性において， 倍数性キメラの花粉は四倍体と同様に二倍性と四倍性を示した． これらのことから， 本研究において， コルヒチン処理によって作出した倍数性キメラで， 生育良好な個体は， 花粉および胚のうの起源層である L2 が四倍性を示す $2x-4x-4x$ 倍数性キメラであると推定された．



第 1-1 図 コルヒチン処理と芽接ぎの併用法による染色体倍加の手順

第1-1表 供試品種一覧

品種	交配組合せ	学名	胚数
安政柑		<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Merr.	単胚
水晶文旦		<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Merr.	単胚
大橋		<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Merr.	単胚
土佐文旦		<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Merr.	単胚
農間紅八朔		<i>Citrus hassak</i> hort. ex Tanaka	単胚
はるか	ヒュウガナツの自然交雑実生	<i>Citrus</i> sp. (hybrids)	多胚
西之香	清見 × トロビタオレンジ	(<i>Citrus unshiu</i> Marcow. × <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck) × <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	単胚
清見	宮川早生 × トロビタオレンジ	<i>Citrus unshiu</i> Marcow. × <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	単胚
安芸タンゴール	興津早生 × トロビタオレンジ	<i>Citrus unshiu</i> Marcow. × <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	単胚
ありあけ	清家ネーブル × クレメンティン	<i>Citrus sinensis</i> Osbeck var. <i>brasiliensis</i> Tanaka × <i>Citrus clementina</i> hort. ex Tanaka	単胚
不知火	清見 × 中野3号ボンカン	(<i>Citrus unshiu</i> Marcow. × <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck) × <i>Citrus reticulata</i> Blanco	多胚
はるみ	清見 × ボンカンF-2432	(<i>Citrus unshiu</i> Marcow. × <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck) × <i>Citrus reticulata</i> Blanco	多胚
広島果研11号	清見 × サザンレッド(カラ×オセオラ)	(<i>Citrus unshiu</i> Marcow. × <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck) × ((<i>Citrus unshiu</i> Marcow. × <i>Citrus nobilis</i> Lour.) × (<i>Citrus clementina</i> hort. ex Tanaka × (<i>Citrus paradisi</i> Macfad. × <i>Citrus tangerina</i> hort. ex Tanaka)))	単胚
安芸まりん	清見 × サザンレッド(カラ×オセオラ)	(<i>Citrus unshiu</i> Marcow. × <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck) × ((<i>Citrus unshiu</i> Marcow. × <i>Citrus nobilis</i> Lour.) × (<i>Citrus clementina</i> hort. ex Tanaka × (<i>Citrus paradisi</i> Macfad. × <i>Citrus tangerina</i> hort. ex Tanaka)))	単胚
あまつづみ	安芸タンゴール×サザンレッド(カラ×オセオラ) (清見×アンゴール)×マーコット	(<i>Citrus unshiu</i> Marcow. × <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck) × ((<i>Citrus unshiu</i> Marcow. × <i>Citrus nobilis</i> Lour.) × (<i>Citrus clementina</i> hort. ex Tanaka × (<i>Citrus paradisi</i> Macfad. × <i>Citrus tangerina</i> hort. ex Tanaka)))	単胚
せとか		((<i>Citrus unshiu</i> Marcow. × <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck) × (<i>Citrus nobilis</i> Lour. × <i>Citrus deliciosa</i> Ten)) × (<i>Citrus sinensis</i> × <i>Citrus tangerina</i> hort. ex Tanaka)	多胚
はれひめ	E-647(清見×オセオラ)×宮川早生	((<i>Citrus unshiu</i> Marcow. × <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck) × (<i>Citrus clementina</i> hort. ex Tanaka × (<i>Citrus paradisi</i> Macfad. × <i>Citrus tangerina</i> hort. ex Tanaka))) × <i>Citrus unshiu</i> Marcow.	単胚
大津4号		<i>Citrus unshiu</i> Marcow.	多胚
石地		<i>Citrus unshiu</i> Marcow.	多胚
道台系ピラフアンカ		<i>Citrus limon</i> (L.) Bum.f.	多胚

第1-2表 カンキツのホルヒチン処理により作出した倍数性別個体数

品種	処理 腋芽数	伸長 腋芽数	選抜 個体数 ^z	倍数性別個体数 ^y ^x			獲得率(%) ^{xw}	
				2x	2x+4x	4x	2x+4x	4x
安政柑 ^v	412	38	1	0	1	-	0.2	0.0
水晶文旦 ^v	258	13	12	9	1	2	0.4	0.8
大橘 ^v	823	54	3	1	0	2	0.0	0.2
土佐文旦	95	44	9	0	3	6	3.2	6.3
農間紅八朔 ^v	658	62	3	0	1	2	0.2	0.3
はるか	590	229	24	2	17	1	2.9	0.2
西之香 ^v	695	284	13	11	1	1	0.1	0.1
清見 ^v	227	52	2	0	0	2	0.0	0.9
安芸タンゴール ^v	430	133	10	3	5	2	1.2	0.5
ありあけ ^v	279	59	9	6	0	3	0.0	1.1
不知火	32	6	2	0	2	-	6.3	0.0
はるみ	244	105	6	5	1	-	0.4	0.0
広島果研11号 ^v	627	205	44	24	15	5	2.4	0.8
安芸まりん ^v	187	41	3	1	2	-	1.1	0.0
あまつづみ ^v	270	79	8	7	1	-	0.4	0.0
せとか	522	169	11	9	1	1	0.2	0.2
はれひめ	629	289	93	35	30	28	4.8	4.5
大津四号	217	118	5	4	1	-	0.5	0.0
石地	294	163	17	15	1	1	0.3	0.3
道谷系ビラフランカ	257	67	18	7	2	9	0.8	3.5
合計	7746	2210	293	139	85	65	1.3	1.0

^z達観により、葉が厚いなど染色体倍加の可能性がある個体を選抜

^yホルヒチン処理後1年6か月経過した個体について、葉の中央脈および側脈を除いた葉身中央部の倍数性をフローサイトメトリー(Ploidy Analyzer PA, Partec社)で測定

^x2x;二倍性 4x;四倍性を示す

^w処理した腋芽数に対する作出した個体数の割合

^v金好ら(2008)より引用



第 1-3 図 コルヒチン処理で得られた 10～17 年生の倍数体

第1-3表 コルヒチン処理により作出した倍数性キメラの組織別倍数性²⁾

品種	個体の 倍数性	葉組織		花粉	果実組織			
		葉身 ^x	維管束 ^w		果皮 ^v	フラベド+ アルベド ^u	じょうのう膜	砂じょう
安政柑	キメラ	2x, 4x	4x	2x, 4x	2x, 4x	4x	2x, 4x	2x, 4x
土佐文旦	2x	– ^t	–	x, 2x	2x	2x	2x	2x
	キメラ	2x, 4x	4x	2x, 4x	2x, 4x	4x	2x, 4x	2x, 4x
農間紅八朔	2x	–	–	x, 2x	2x	2x	2x	2x
	4x	4x	–	2x, 4x	4x	4x	4x	4x
	キメラ	2x, 4x	–	2x, 4x	–	4x	2x, 4x	2x, 4x
はるか	2x	–	–	x, 2x	2x	2x	2x	2x
	4x	4x	–	2x, 4x	–	–	–	–
	キメラ	2x, 4x	4x	2x, 4x	2x, 4x	4x	2x, 4x	2x, 4x
安芸タンゴール	2x	–	–	N.D. ^s	2x	2x	2x	2x
	4x	4x	–	N.D.	4x	4x	4x	4x
	キメラ	2x, 4x	4x	N.D.	2x, 4x	4x	2x, 4x	2x, 4x
不知火	2x	–	–	N.D.	2x	2x	2x	2x
	キメラ	2x, 4x	4x	2x, 4x	2x, 4x	4x	2x, 4x	2x, 4x
はるみ	キメラ	2x, 4x	4x	N.D.	2x, 4x	4x	2x, 4x	2x, 4x
広島果研11号	2x	–	–	N.D.	2x	2x	2x	2x
	4x	4x	–	N.D.	4x	4x	4x	4x
	キメラ	2x, 4x	4x	N.D.	2x, 4x	4x	2x, 4x	2x, 4x
安芸まりん	キメラ	2x, 4x	–	–	–	–	–	–
あまつづみ	キメラ	2x, 4x	4x	N.D.	2x, 4x	4x	2x, 4x	2x, 4x
せとか	キメラ	2x, 4x	–	–	–	–	–	–
はれひめ	2x	–	–	N.D.	2x	2x	2x	2x
	4x	4x	–	N.D.	4x	4x	4x	4x
	キメラ	2x, 4x	4x	N.D.	2x, 4x	4x	2x, 4x	2x, 4x
大津四号	キメラ	2x, 4x	4x	N.D.	2x, 4x	4x	2x, 4x	2x, 4x
石地	2x	–	–	N.D.	2x	2x	2x	2x
	4x	4x	–	N.D.	4x	4x	4x	4x
	キメラ	2x, 4x	4x	N.D.	2x, 4x	4x	2x, 4x	2x, 4x

²⁾フローサイトメトリーで測定

^y 2x; 二倍性 4x; 四倍性を示す キメラ; 二倍性細胞と四倍性細胞が混在していた個体

^x 中央脈および側脈を除く葉身

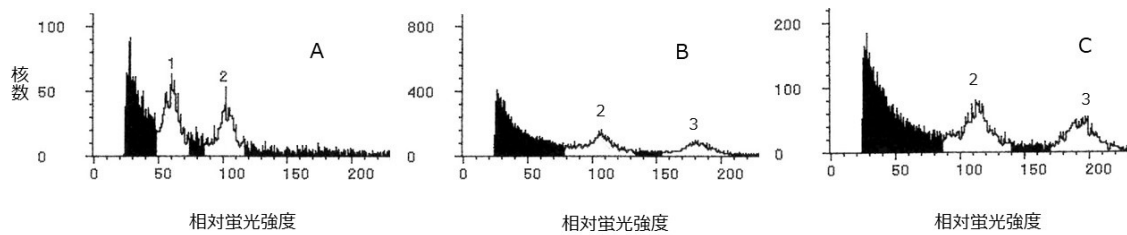
^w 中央脈の維管束

^v 表皮を含む果皮(厚さ2～3mm)に切り取る)

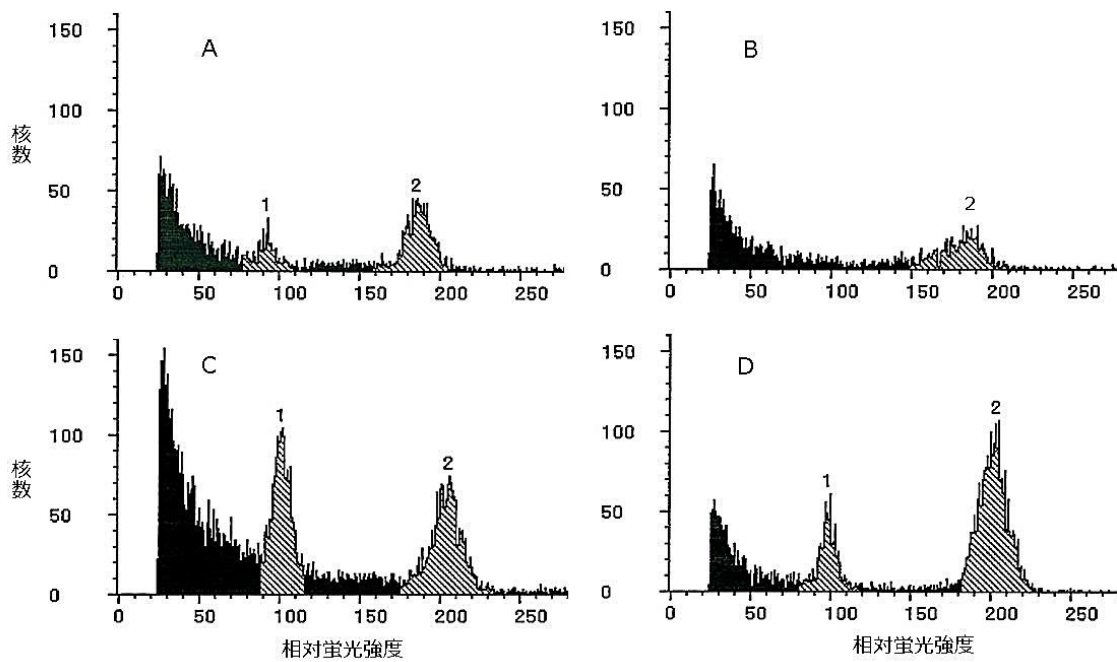
^u 表皮を含まないフラベドとアルベド

^t 調査していないことを示す

^s 花粉が無いあるいは少なく倍数性を検出できなかったことを示す



第 1-4 図 ‘はるか’ における花粉の倍数性
 A : 二倍体 B : 四倍体 C : 倍数性キメラ
 ピーク 1 : 半数性 ピーク 2 : 二倍性 ピーク 3 : 四倍性



第 1-5 図 倍数性キメラ ‘広島果研 11 号’ における果実の組織別倍数性
 A : 表皮を含む果皮 B : 表皮を含まないフラベド+アルベド C : じょうのう膜 D : さじょう
 ピーク 1 : 二倍性 ピーク 2 : 四倍性

第 2 章 コルヒチン処理により作出した四倍体および $2x-4x-4x$ 倍数性キメラの葉，花および果実の形態的特性

第 1 章で，コルヒチン処理により倍数体の作出を行った．その結果，四倍体および $2x-4x-4x$ 倍数性キメラが得られた確率は，いずれも $0.0\sim 6.3\%$ で低く，品種によって異なった．したがって，四倍体および $2x-4x-4x$ 倍数性キメラを確保するためには，多数の腋芽をコルヒチン処理し，倍数性の判定ができる 1 年 6 か月以上育苗して倍数性を調査しなければならない．そこで，染色体倍加に伴う形態的特性を利用して，コルヒチン処理個体群から四倍体あるいは $2x-4x-4x$ 倍数性キメラを粗選抜できれば，フローサイトメトリーによる解析を大幅に効率化できる．カンキツ属の四倍体の形態的特性については，生山（1992）がハッサク，ヒュウガナツおよびクレメンティンで，キンカン属の四倍体および $2x-4x-4x$ 倍数性キメラの形態的特性については，安田ら（2008），糠谷ら（2011）がニンポウキンカンで報告しているが，その他の品種では明らかになっていない．ここでは，過去に報告されている品種以外で，染色体倍加に伴う形態的特性を調査し，四倍体および $2x-4x-4x$ 倍数性キメラと二倍体との差異を明らかにして，これによって倍数体候補個体を予め選抜し，フローサイトメトリーでの倍数性判定の効率化を図ることを目的とした．

第 1 節 四倍体および $2x-4x-4x$ 倍数性キメラの葉の形態的特性

材料および方法

第 1 章で作出・選抜し，広島県立総合技術研究所農業技術センター果樹研究部（東広島市安芸津町）の無加温ガラス室にて $45\sim 60\text{ L}$ ポットで育成中の四倍体 11 品種（第 2-1 表）および $2x-4x-4x$ 倍数性キメラ 12 品種（第 2-2 表）について，2007～2009 年にこれらの葉の形質を調査した．対照は，同ガラス温室内で育苗した各品種の二倍体とした．葉は，当年の硬化した春枝の中位葉 10 枚を，晴天日の午前中 9～10 時にサンプリングし，葉の厚さ，葉身長，葉幅長，

葉色，気孔縦径，気孔横径および気孔密度を調査した．葉の厚さはマイクロメータ，葉身長および葉幅長はノギス，葉色は，葉緑素計（ミノルタ，SPAD-502）を用いて測定した．なお，葉の厚さと葉色は，中央脈と側脈を除いた葉身中央部を測定した．また，葉裏中央付近の表皮を両刃カミソリで薄く剥ぎとり，葉1枚につき5個の気孔について，縦径および横径を測定した．さらに，顕微鏡下で視野面積内の気孔数を計数し， 1 mm^2 当たりの気孔数に換算した．

結果

四倍体では，11品種すべてにおいて，二倍体と比較して有意に葉が厚く，気孔密度が低かった（第2-1表，第2-1図，第2-2図）．また，10品種で二倍体と比較して有意に葉幅長が大きく，葉形指数が小さく，葉色が濃かった．一方， $2x-4x-4x$ 倍数性キメラでは，12品種すべてにおいて，葉が二倍体と比較して有意に厚かった（第2-2表，第2-1図）．また，10品種で二倍体と比較して有意に葉幅長が大きく，葉形指数が小さかった．気孔密度などその他の形質では明確な差が見られなかった（第2-2図）．

第2節 四倍体および $2x-4x-4x$ 倍数性キメラの花の形態的特性

材料および方法

第2章第1節で供試した同一個体から，4～5月に，1枚の花弁がほころびはじめた状態の花蕾を20個サンプリングし，花蕾重，花弁数，花弁長，花弁幅および雄ずい数について調査した．また，2013～2014年に，四倍体9品種（第2-5表）および $2x-4x-4x$ 倍数性キメラ5品種（第2-6表）の花粉特性を調査した．花粉量は，種苗特性分類調査報告書・カンキツ類（愛媛県立果樹試験場，1994）の方法により，無，少，中，多の四段階で評価した．花粉粒径と花粉稔性については，開花直前の花蕾を4～5月に各品種とも5個以上採取し， 25°C 10時間日長に設定した人工気象室内で開葯した花粉を -30°C で冷凍保存し，3か月後に解凍して1%アセトカーミン液で染色して

観察した。花粉粒径は、花粉粒の垂直に交わる 2 つの直径の平均値とし、1 反復当たり 10 粒を調査し、5 反復とした。花粉稔性は、1 反復当たり 500 粒を調査し、5 反復とした。いずれの調査も、対照は同ガラス室で育苗した各品種の二倍体とした。

結果

四倍体では、9 品種で花蕾が二倍体と比較して有意に重かったが、その他の形質では二倍体と明確に区別できる差は見られなかった（第 2-3 表）。2x-4x-4x 倍数性キメラでは、8 品種で花蕾が二倍体と比較して有意に重かったが、その他の形質では二倍体と明確に区別できる差は見られなかった（第 2-4 表）。

四倍体の花粉は、供試した 9 品種すべてにおいて、二倍体と比較して花粉粒径が有意に大きかった（第 2-5 表、第 2-3 図）。また、‘道谷系ビラフランカ’ [*C.limon* (L.) Burn.f.] を除く 8 品種において花粉稔性が二倍体と比較して有意に低かった。2x-4x-4x 倍数性キメラ個体の花粉は、供試した 5 品種すべてにおいて、二倍体と比較して花粉粒径が有意に大きかった（第 2-6 表、第 2-4 図）。また、花粉稔性は、‘土佐文旦’、‘安芸タンゴール’ [*C.unshiu* Marcow. × *C.sinensis* (L.) Osbeck]、‘広島果研 11 号’ [(*C.unshiu* Marcow. × *C.sinensis* (L.) Osbeck) × ((*C.unshiu* Marcow. × *C.nobilis* Lour.) × (*C.clementina* hort. ex Tanaka × (*C.paradisi* Macfad. × *C.tangerina* hort. ex Tanaka)))] が二倍体と比較して有意に低く、‘はるか’と‘不知火’は有意差がなかった。

第 3 節 四倍体および 2x-4x-4x 倍数性キメラの果実の形態的特性 材料および方法

2007～2013 年に、第 2 章第 1 節で供試した個体のうち、結実した四倍体 9 品種（第 2-7 表）および 2x-4x-4x 倍数性キメラ 7 品種（第 2-8 表）について、果実特性の調査を行った。対照は同ガラス室で育苗した各品種の二倍体とした。完熟した 3～5 果の自然受粉による

果実を採取し，果実重，果実縦径，果実横径，果形指数，果皮厚，果皮重，果肉歩合，完全種子数，不完全種子（種子長 8 mm 以上）数および完全種子重を調査した．

結果

四倍体の果実は，供試したすべての品種で，二倍体と比較して果皮が有意に厚かった．また，‘水晶文旦’ [*C.maxima* (Burm.) Merr.] を除く 8 品種で，二倍体と比較して果肉歩合が低かった（第 2-7 表，第 2-5 図）．その他の果実形質においては品種によって傾向が異なった．一方，2x-4x-4x 倍数性キメラ個体の果実は，供試した 7 品種のうち 3 品種で二倍体と比較して果皮が有意に厚く，5 品種で二倍体と比較して果肉歩合が有意に低かったが，その他の果実形質においては品種・系統によって傾向が異なった（第 2-8 表，第 2-5 図）．

第 4 節 考察

カンキツのコルヒチン処理により作出された四倍体の葉の特性については，生山（1992）が，クレメンティン，ハッサクおよびヒュウガナツで，二倍体と比較して葉が厚く，葉形指数が小さく，気孔密度が低いという報告をしている．また，ニンボウキンカンでも，二倍体と比較して葉が厚く，葉形指数が小さく，気孔の縦径・横径が大きく，気孔密度が低いという報告がある（河瀬ら，2005；糠谷ら，2011）．本研究でも，供試した 11 品種すべての四倍体において，葉の肥厚と気孔密度の低下が，10 品種において葉形指数の低下，気孔縦径・横径の肥大が確認され，これまでの報告と一致した．また，本研究では，10 品種で葉色の濃化が認められた．一方，2x-4x-4x 倍数性キメラの特性については事例が少なく，ニンボウキンカンで葉の肥厚が認められるが（糠谷ら，2011；安田ら，2008），気孔密度をはじめ，他の形質に二倍体と明確な差がないことが報告されている（安田ら，2008）．本研究でも，供試した 12 品種すべてにおいて，葉が二倍体と比較して厚かったが，気孔の大きさおよび密度につい

では、二倍体との間に一定の傾向は見られず、ニンポウキンカンでの報告と一致した。また、葉色も一定の傾向が見られなかった。カンキツでは、L1 から表皮系が、L2 から表皮以外の葉の大部分と花粉および胚のうが、L3 から茎や葉の中心部と子房内部が形成される（岩政，1999； Sugawara ら，2002）。本研究で供試した 2x-4x-4x 倍数性キメラは葉の表皮組織を形成する L1 が二倍体であるため、気孔の大きさおよび気孔密度に二倍体との差が明確に現れなかったと考えられた。

花については、四倍体のクレメンティン、ハッサク、ヒュウガナツ（生山，1992）およびニンポウキンカン（河瀬ら，2005；糠谷ら，2011）で花卉の肥大が認められ、2x-4x-4x 倍数性キメラニンポウキンカンの花卉幅長と子房横径は二倍体よりも有意に大きい（安田ら，2008）、いずれもその他の形質については有意差が認められなかったことを報告している。本研究では、供試した四倍体および 2x-4x-4x 倍数性キメラで花蕾の肥大が認められた品種があったが、その他の形質においては二倍体と区別するための一定の傾向は見られなかった。

四倍体の花粉については、‘福原オレンジ’、ヒュウガナツ、クレメンティン（生山，1992）、ニンポウキンカン（河瀬ら，2005；糠谷ら，2011）において、2x-4x-4x 倍数性キメラの花粉については、ニンポウキンカン（糠谷ら，2011；安田ら，2008）において、花粉粒径が二倍体と比較して有意に大きいことが報告されている。本研究でも、供試した四倍体および 2x-4x-4x 倍数性キメラのすべての品種において花粉粒径が二倍体と比較して有意に大きいことが明らかになった。

カンキツの同質四倍体では、花粉形成における減数分裂の過程で異常が起こるため、花粉稔性が低下することが知られている（Frost・Soost，1968）。本研究では、四倍体および 2x-4x-4x 倍数性キメラのいずれにおいても、花粉量が多い‘大橘’[*C.maxima*(Burm.) Merr.]，‘水晶文旦’，‘農間紅八朔’，‘はるか’および‘道谷系ビラ

フランカ’の花粉稔性の低下程度が小さい，あるいは低下しなかった．一方で，花粉量が中の‘西之香’[(*C.unshiu* Marcow.×*C.sinensis* (L.) Osbeck)×*C.sinensis*(L.) Osbeck]，‘ありあけ’[*C.sinensis* Osbeck var.*brasiliensis* Tanaka×*C.clementina* hort. ex Tanaka]，‘広島果研 11 号’および‘安芸タンゴール’の花粉稔性は大幅に低下した．このように，‘不知火’を除く 10 品種は，花粉量によって花粉稔性の低下程度が異なることが示唆された．

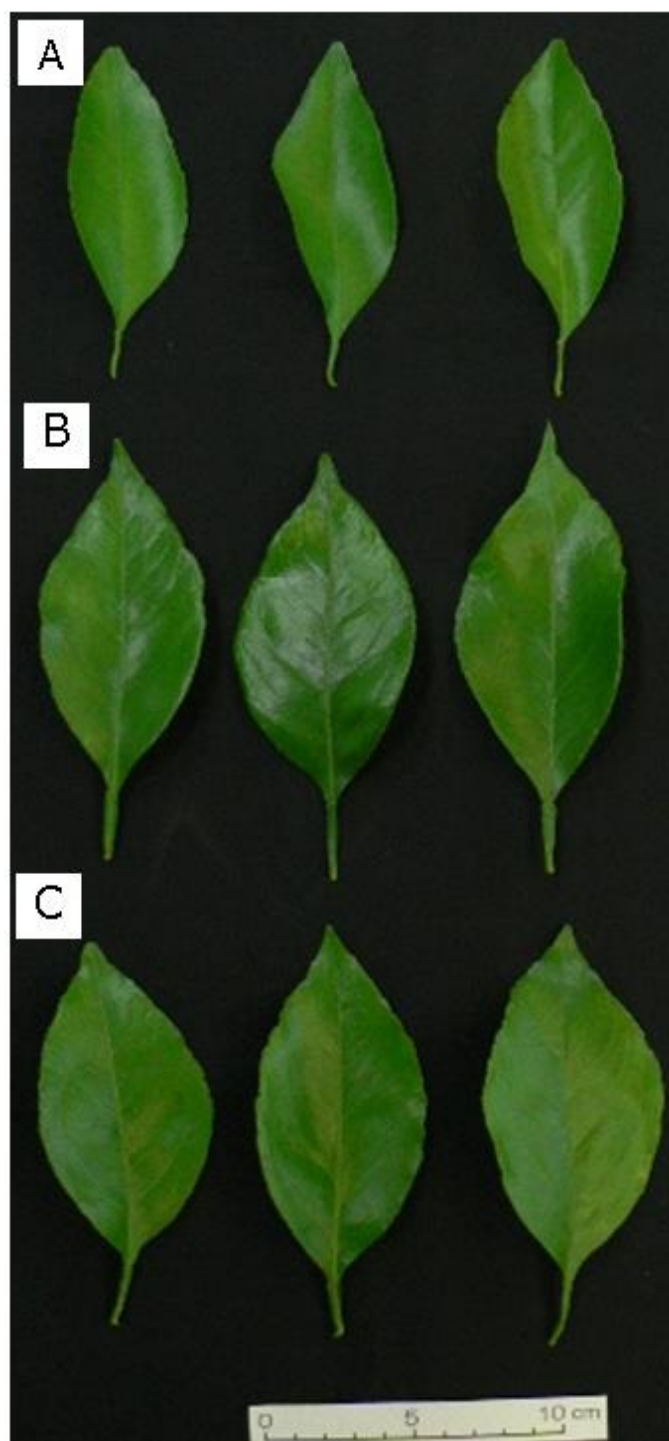
四倍体および 2x-4x-4x 倍数性キメラの果実では，河瀬ら（2005），糠谷ら（2011），安田ら（2008）が，ニンポウキンカンの果実が二倍体と比較して有意に重く，果皮が厚く，果皮歩合が高いことを報告している．また，Cameron・Frost（1968）は，カンキツの四倍体果実が二倍体と比較して果皮が厚く，果汁割合が低いことを報告している．本研究においては，四倍体は二倍体と比較して有意に果皮が厚いが，その他の形質は品種によって異なった．また，2x-4x-4x 倍数性キメラ個体でも，品種によって傾向が異なっていた．

以上のことから，コルヒチン処理により作出した四倍体は，二倍体と比較して葉が厚く，気孔密度が低く，花粉粒径が大きいことが，2x-4x-4x 倍数性キメラは，四倍体と同様に二倍体と比較して葉が厚く，花粉粒径が大きい，気孔密度に有意差は認められないことが明らかになった．これらの形態的特性は，三倍体育成のための交配親の作出を目的としたコルヒチン処理個体群から，四倍体および 2x-4x-4x 倍数性キメラ候補を粗選抜するために利用でき，フローサイトメトリーによる倍数性解析の効率化を図ることが可能と考えられた．

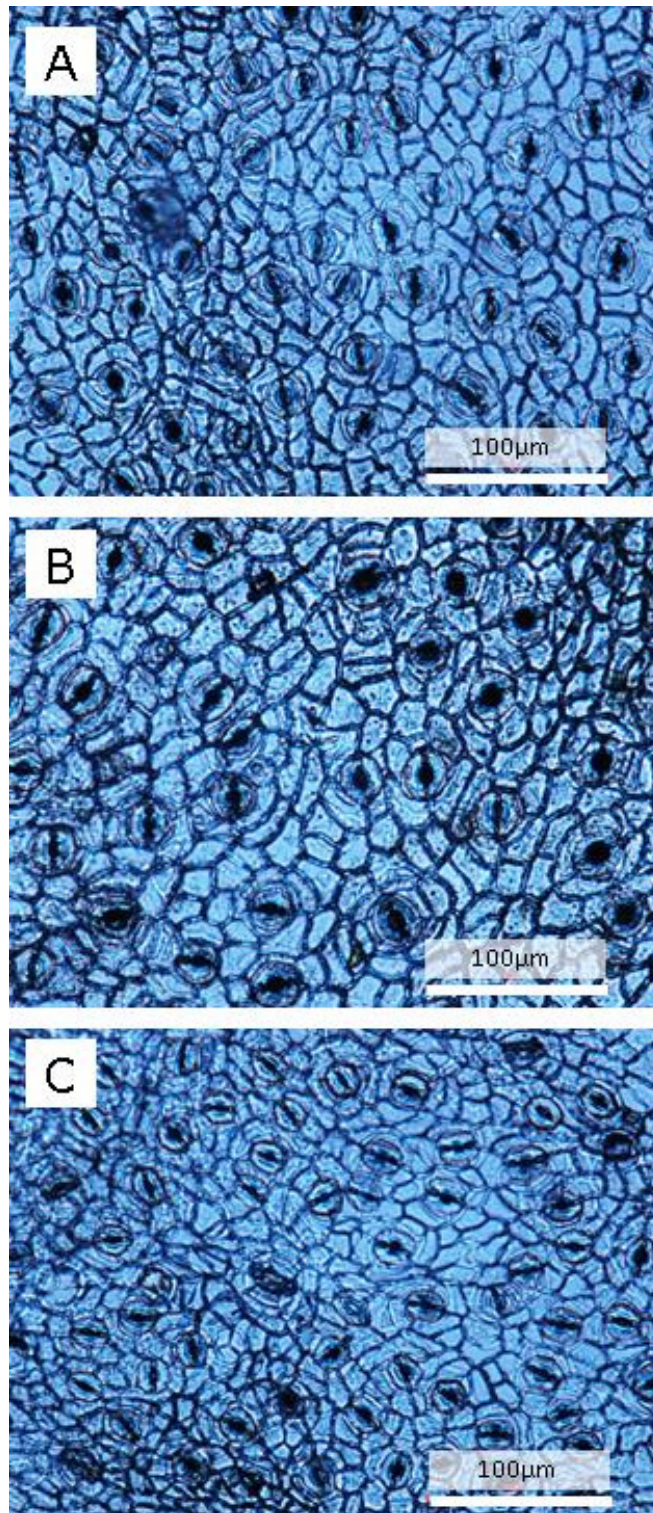
第 5 節 摘要

コルヒチン処理により得られた四倍体および 2x-4x-4x 倍数性キメラについて，葉，花および果実の形態的特性を調査した．供試した四倍体 11 品種および 2x-4x-4x 倍数性キメラ 12 品種すべてにおいて，葉が二倍体と比較して厚かった．また，四倍体は，すべての品種で

気孔密度が二倍体と比較して低かったが、 $2x-4x-4x$ 倍数性キメラでは一定の傾向が見られなかった。花では、四倍体および $2x-4x-4x$ 倍数性キメラのいずれも二倍体との間に一定の傾向は認められなかったが、花粉粒径は、供試した四倍体 9 品種および $2x-4x-4x$ 倍数性キメラ 5 品種すべてにおいて、二倍体と比較して有意に大きかった。これらのことから、葉の厚さおよび花粉粒径は、コルヒチン処理個体群から四倍体および $2x-4x-4x$ 倍数性キメラを選抜するために利用でき、フローサイトメトリーによる倍数性解析の効率化を図ることができると考えられた。また、 $2x-4x-4x$ 倍数性キメラは四倍体と同様に花粉粒径が大きく、三倍体の育成親としての有効性が示唆された。



第 2-1 図 ‘広島果研 11 号’ の葉
A : 二倍体
B : 四倍体
C : 2x-4x-4x 倍数性キメラ



第 2-2 図 ‘安芸タンゴール’ の気孔

A : 二倍体

B : 四倍体

C : 2x-4x-4x 倍数性キメラ

第2-1表 コルヒチン処理により作出した四倍体の葉の形態的特性

品種	倍数性 ²	個体数	葉の厚さ (mm)	葉身長 (mm)	葉幅長 (mm)	葉形指数 (葉身長/ 葉幅長)	葉色 (SPAD)	気孔		
								縦径 (μm)	横径 (μm)	密度 (個・ mm^{-2})
水晶元旦	2x	1	0.33	70.3	40.7	1.7	50.1	8.3	6.3	636.5
	4x	5	0.48 ** ³	96.1 **	73.1 **	1.4 **	63.4 **	11.4 **	9.0 **	267.6 **
大橋	2x	1	0.37	86.2	49.3	1.8	83.1	9.1	6.9	499.0
	4x	2	0.49 **	100.9 **	69.1 **	1.5 **	87.8 **	13.1 **	8.8 **	282.0 **
農間紅八朔	2x	1	0.35	97.6	54.3	1.8	56.5	9.3	6.6	430.2
	4x	2	0.44 **	100.8	74.4 **	1.4 **	70.9 **	12.3 **	9.1 **	280.0 **
はるか	2x	1	0.26	64.5	35.1	1.8	71.0	6.6	5.1	595.9
	4x	1	0.34 **	77.3 *	53.2 **	1.5 **	74.1	11.1 **	8.2 **	273.5 **
西之香	2x	1	0.28	81.6	31.1	2.6	56.8	6.0	4.2	471.4
	4x	1	0.45 **	99.1 **	43.4 **	2.3 **	64.0 **	8.6 **	5.8 **	242.2 **
清見	2x	1	0.27	96.7	40.1	2.4	49.3	9.1	6.7	501.1
	4x	8	0.37 **	81.5 **	46.0 *	1.8 **	54.5 *	12.6 **	8.6 **	323.2 **
安芸タンゴール	2x	1	0.34	76.7	32.1	2.4	42.9	13.3	9.8	479.2
	4x	3	0.42 **	87.9 **	45.0 **	2.0 **	61.0 **	12.7	9.7	312.0 **
ありあけ	2x	1	0.29	77.7	35.3	2.2	68.0	9.8	6.9	422.4
	4x	2	0.39 **	84.6 **	47.6 **	1.8 **	79.5 **	13.4 **	9.4 **	278.7 **
広島果研11号	2x	1	0.28	103.7	45.7	2.3	52.8	10.2	7.3	446.9
	4x	2	0.37 **	100.5	47.2	2.1	59.7 *	12.5 **	9.6 **	278.5 **
石地	2x	1	0.27	80.0	32.0	2.5	61.4	7.8	6.5	465.1
	4x	2	0.44 **	93.4 **	58.1 **	1.6 **	76.1 **	12.6 **	10.3 **	244.0 **
道谷系ビラフランカ	2x	1	0.30	105.5	47.9	2.2	47.4	7.9	6.3	491.2
	4x	1	0.38 **	112.7	66.2 **	1.7 **	73.1 **	10.6 **	8.5 **	310.4 **

²2x: 二倍性 4x: 四倍性を示す

³***および**はステューデントのt検定によりそれぞれ1%および5%水準で有意差があることを示す

第2-2表 コルヒチン処理により作出した2x-4x-4x倍数性キメラの葉の形態的特性

品種	倍數性 ^z	個体数	葉の厚さ		葉身長 (mm)	葉幅長 (mm)	葉形指数 (葉身長/ 葉幅長)	葉色 (SPAD)	気孔		
			(mm)	(mm)					縦径 (μm)	横径 (μm)	密度 (個・mm ⁻²)
土佐文旦	2x	1	0.35		85.1	49.1	1.7	67.8	9.3	6.5	550.0
	キメラ	2	0.42	*** ^y	97.9 *	70.9 **	1.4 **	82.2 **	10.0 **	7.3 **	512.0
農間紅八朔	2x	1	0.35		97.6	54.3	1.8	56.5	9.3	6.6	430.2
	キメラ	1	0.47	**	104.3	75.4 **	1.4 **	65.5 **	9.5	6.5	414.6
安芸タンゴール	2x	1	0.34		76.7	32.1	2.4	42.9	13.3	9.8	479.2
	キメラ	4	0.46	**	88.7 **	48.5 **	1.8 **	67.1 **	10.8 **	7.9 **	463.4
不知火	2x	1	0.29		77.5	43.3	1.8	61.0	9.5	6.7	482.3
	キメラ	1	0.39	**	86.9 **	53.3 **	1.6 **	77.0 **	10.3 **	7.4 **	444.8
はるみ	2x	1	0.30		79.9	45.4	1.8	63.4	9.4	6.1	396.4
	キメラ	1	0.36	**	88.7	50.2 *	1.8	66.0	10.1	6.0	369.3
広島果研11号	2x	1	0.28		103.7	45.7	2.3	52.8	10.2	7.3	446.9
	キメラ	6	0.39	**	93.9 *	44.0	2.1 *	54.4	11.3	7.9	372.9 **
安芸まりん	2x	1	0.27		101.1	45.4	2.2	68.4	9.6	7.1	437.0
	キメラ	1	0.33	**	85.2 **	52.6 *	1.6 **	56.3 **	9.6	7.3	439.1
あまつづみ	2x	1	0.27		97.3	48.6	2.0	48.9	9.3	7.6	399.5
	キメラ	1	0.38	**	76.7 **	42.2	1.8	59.7 **	9.9 *	7.7	379.7
せとか	2x	1	0.33		63.6	26.4	2.4	72.3	8.9	6.1	440.1
	キメラ	1	0.42	**	76.3 **	46.6 **	1.7 **	57.1 **	9.7 **	6.5	429.2
はれひめ	2x	1	0.25		98.7	37.6	2.6	68.7	10.0	7.3	482.8
	キメラ	2	0.36	**	81.0 **	37.5	2.2 **	66.3	10.3	7.4	406.3 **
大津四号	2x	1	0.30		144.8	68.1	2.2	71.5	10.2	6.3	513.3
	キメラ	1	0.41	**	122.0 *	67.4	1.8 *	70.7	9.0	5.2	400.6 **
石地	2x	1	0.27		80.0	32.0	2.5	61.4	7.8	6.5	465.1
	キメラ	2	0.39	**	92.6 **	49.5 **	1.9 **	75.7 **	8.7 *	7.2 *	381.0 **

^z2x; 二倍性を示す キメラ; 茎頂分裂組織第1層が2x, 第2層が4x, 第3層が4xの2x-4x-4x周縁キメラと推定した個体
^y ***および**はステューデントのt検定によりそれぞれ1%および5%水準で有意差があることを示す

第2-3表 コルヒチン処理により作出した四倍体の花の形態的特性

品種	倍数性 ^z	個体数	花蕾重 (g)	花弁数 (枚)	花弁長 (mm)	花弁幅 (mm)	花弁長 /花弁幅	雄蕊数 (本)
水晶文旦	2x	1	0.7	3.8	21.6	9.6	2.3	30.8
	4x	5	1.6 *** ^y	4.3 **	24.4 **	10.8 **	2.3	26.3 **
大橘	2x	1	1.0	4.4	22.6	10.4	2.2	30.4
	4x	2	1.7 **	4.2	22.8	11.0	2.1	28.6 *
農間紅八朔	2x	1	0.8	5.0	19.9	9.4	2.1	26.7
	4x	2	1.1 **	4.9	20.9	9.5	2.2	25.6 *
はるか	2x	1	0.3	5.1	13.5	6.6	2.1	22.8
	4x	1	0.3	5.0	9.2 **	5.7 **	1.6 **	22.1
西之香	2x	1	0.6	5.0	20.9	7.0	3.0	20.4
	4x	1	0.6	5.0	15.3 **	6.0 **	2.6 *	21.4 *
清見	2x	1	0.3	4.9	13.7	5.8	2.4	19.1
	4x	8	0.5 **	4.7	14.7 *	6.8 **	2.2 *	19.1
安芸タンゴール	2x	1	0.5	5.0	19.0	7.4	2.6	19.0
	4x	3	1.0 **	5.1	20.2	8.8 **	2.3 **	19.5
ありあけ	2x	1	0.3	5.1	11.0	5.4	2.1	20.8
	4x	2	0.6 **	5.1	12.2 *	6.7 **	1.8 **	18.5 **
広島果研11号	2x	1	0.2	5.2	12.6	5.5	2.3	21.7
	4x	2	0.5 **	5.1	14.8 **	7.2 **	2.1	22.2
石地	2x	1	0.5	5.0	17.8	7.2	2.5	21.9
	4x	2	0.7 **	4.9	19.7 *	8.3 **	2.4	19.9 **
道谷系ピラフランカ	2x	1	0.6	5.2	21.3	6.5	3.3	33.2
	4x	1	1.1 **	5.4	17.5 **	7.8 **	2.3 **	35.1

^z2x; 二倍性 4x; 四倍性を示す

^y***および**はスチューデントのt検定によりそれぞれ1%および5%水準で有意差があることを示す

第2-4表 コルヒチン処理により作出した2x-4x-4x倍数性キメラの花の形態的特性

品種	倍数性 ^z	個体数	花蕾重 (g)	花弁数 (枚)	花弁長 (mm)	花弁幅 (mm)	花弁長 /花弁幅	雄ざい数 (本)
土佐文旦	2x	1	1.1	4.6	22.8	10.2	2.3	30.9
	キメラ	2	1.3 ** ^y	4.3	23.0	10.4	2.2	30.3
農間紅八湖	2x	1	0.8	5.0	19.9	9.4	2.1	26.7
	キメラ	1	1.4 **	4.9	22.2 *	9.5	2.3 *	27.4
安芸タンゴール	2x	1	0.5	5.0	19.0	7.4	2.6	19.0
	キメラ	4	0.8 **	4.6 *	16.9 *	8.4 *	2.0 **	20.4 **
不知火	2x	1	0.5	5.5	16.0	6.6	2.4	20.6
	キメラ	1	0.6 **	5.7	14.1 **	7.5 **	1.9 **	20.1
はるみ	2x	1	0.3	5.0	11.7	6.4	1.8	17.6
	キメラ	1	0.5 **	4.4 *	12.6	8.8 **	1.5 **	17.0
広島果研11号	2x	1	0.2	5.2	12.6	5.5	2.3	21.7
	キメラ	6	0.5 **	5.1	14.6 **	7.1 **	2.1	22.9
安芸まりん	2x	1	0.6	5.1	16.6	7.1	2.3	27.5
	キメラ	1	0.5 **	5.2	14.1 **	6.8	2.1 **	23.1 **
あまつづみ	2x	1	0.5	5.0	16.2	6.9	2.4	20.9
	キメラ	1	0.4 **	7.1 **	9.8 **	5.8 **	1.7 **	22.5 *
せとか	2x	1	0.3	5.1	12.0	5.3	2.2	19.8
	キメラ	1	0.2 **	5.1	8.9 **	5.1	1.8 **	16.5 **
はれひめ	2x	1	0.2	5.2	11.2	5.2	2.2	16.5
	キメラ	2	0.3 **	4.9	11.7	6.3 **	1.9 **	18.9 **
大津四号	2x	1	0.4	5.1	17.0	6.6	2.6	21.4
	キメラ	1	0.5 **	5.4	13.2 **	6.6	2.0 **	22.0
石地	2x	1	0.5	5.0	17.8	7.2	2.5	21.9
	キメラ	2	0.5	5.1	13.9 **	7.0	2.0 **	19.5 **

^z2x; 二倍性を示す キメラ; 茎頂分裂組織第1層が2x, 第2層が4x, 第3層が4xの2x-4x-4x周縁キメラと推定した個体

^y ** および^zはステューデントの検定によりそれぞれ1%および5%水準で有意差があることを示す

第2-5表 コルヒチン処理により作出した四倍体の花粉特性

品種	個体の 倍数性 ^z	花粉量 ^y	花粉 ^x	
			粒径(μm)	稔性(%)
水晶文旦	2x	多	34.4	94.7
	4x	多	45.0 **	67.0 **
大橘	2x	多	34.7	93.9
	4x	多	41.9 ** ^v	84.2 **
農間紅八朔	2x	多	32.6	94.1
	4x	多	40.4 **	87.1 *
はるか	2x	多	32.2	93.8
	4x	多	41.3 **	87.0 *
西之香	2x	中	30.2	87.0
	4x	- ^w	41.5 *	33.3 **
安芸タンゴール	2x	中	30.5	80.6
	4x	中	39.7 **	18.6 **
ありあけ	2x	中	32.4	68.7
	4x	-	43.1 **	37.7 **
広島果研11号	2x	中	31.1	95.3
	4x	中	44.2 **	11.2 **
道谷系ピラフランカ	2x	多	35.5	53.8
	4x	多	40.8 *	62.0

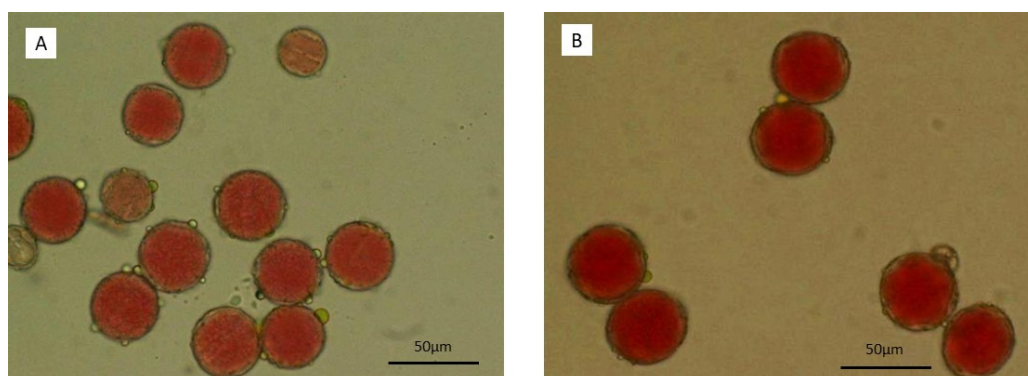
^z2x; 二倍性 4x; 四倍性を示す

^y種苗特性分類調査報告書(カンキツ類)の方法による無, 少, 中, 多の四段階評価

^x1%アセトカーミンによる染色

^w-はデータがないことを示す

^v**および*はステューデントのt検定によりそれぞれ1%および5%水準で有意差があることを示す



第 2-3 図 ‘大橘’ における 1% アセトカーミンで染色した花粉

A : 二倍体 B : 四倍体

第2-6表 コルヒチン処理により作出した2x-4x-4x倍数性キメラの花粉特性

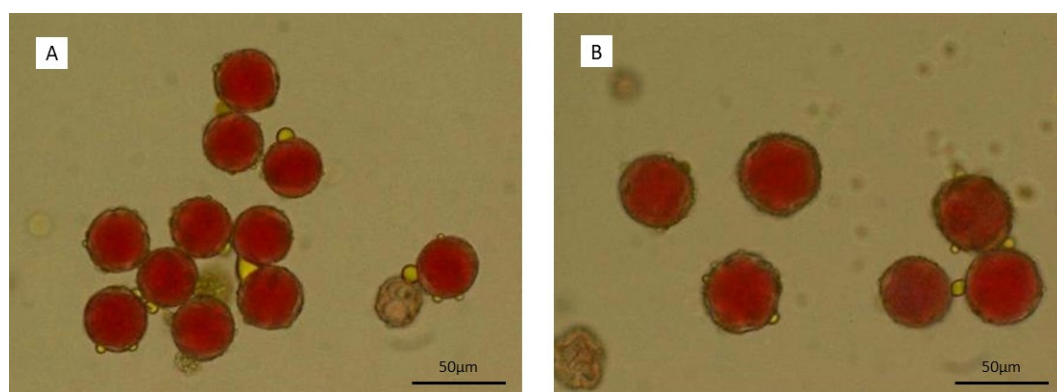
品種	個体の 倍数性 ^z	花粉量 ^y	花粉 ^x	
			粒径 (μm)	稔性 (%)
土佐文旦	2x	多	33.5	93.2
	キメラ	多	41.9 ** ^w	78.9 **
はるか	2x	多	31.8	94.0
	キメラ	多	40.2 **	91.2
安芸タンゴール	2x	中	31.7	69.9
	キメラ	中	42.3 **	17.3 **
不知火	2x	少	29.6	80.5
	キメラ	少	34.6 *	82.1
広島果研11号	2x	中	30.3	96.4
	キメラ	中	38.2 **	17.8 **

^z2x;二倍性を示す キメラ; 茎頂分裂組織第1層が2x, 第2層が4x, 第3層が4xの2x-4x-4x周縁キメラを示す

^y種苗特性分類調査報告書(カンキツ類)の方法による無, 少, 中, 多の四段階評価

^x1%アセトカーミンによる染色

^w**および*はスチューデントのt検定によりそれぞれ1%および5%水準で有意差があることを示す



第 2-4 図 ‘土佐文旦’ における 1% アセトカーミンで染色した花粉
A : 二倍体 B : 2x-4x-4x 倍数性キメラ

第2-7表 コルヒチン処理により作出した四倍体の自然受粉による果実特性

品種	個体の 倍数性 ^z	果実数	収穫 時期	果実重 (g)	果実径 (mm)		果形指数 ^y	果皮厚 (mm)	果皮重 (g)	果肉歩合 ^x (%)		1果当たり種子数 ^w		完全種子重 (g)
					縦径	横径						完全	不完全	
水晶文旦	2x	5	2月	365.2	83.6	111.2	132.9	11.3	149.6	58.7	14.4	5.6	5.6	0.39
	4x	5	上旬	486.1 ^{uv}	91.1	117.3	128.9	13.0 [*]	198.3	59.4	13.4	23.6 ^{**}	23.6 ^{**}	0.29 [*]
大橘	2x	5	2月	294.5	79.7	95.4	119.9	8.4	102.1	65.3	23.4	52.6	52.6	0.17
	4x	5	上旬	454.6 ^{**}	95.9 ^{**}	114.7 ^{**}	119.7	12.2 ^{**}	187.8 ^{**}	58.7 ^{**}	15.6	29.6	29.6	0.24 ^{**}
農間紅八朔	2x	4	2月	361.8	96.0	78.6	122.4	6.6	89.8	75.2	1.3	1.0	1.0	— ^u
	4x	3	上旬	442.9	104.4	85.2	123.0	10.2 [*]	169.8 [*]	61.9 [*]	7.3 ^{**}	2.7	2.7	—
西之香	2x	5	12月	166.9	69.4	70.3	101.3	3.2	30.3	82.0	2.0	2.4	2.4	0.17
	4x	5	上旬	122.2 ^{**}	61.5 ^{**}	63.3 [*]	103.1	4.4 ^{**}	34.0	72.3 ^{**}	1.0	2.4	2.4	0.14
安芸タンゴール	2x	5	12月	183.1	62.5	75.7	121.3	3.1	30.6	83.4	9.4	18.4	18.4	0.23
	4x	5	上旬	234.4 [*]	69.6	83.6 [*]	120.7	5.6 ^{**}	74.6 ^{**}	68.3 ^{**}	3.4 [*]	14.2	14.2	0.10 ^{**}
ありあげ	2x	4	12月	81.4	54.3	55.1	101.6	4.1	24.4	70.4	3.3	2.5	2.5	0.14
	4x	4	上旬	82.5	56.5	54.6	96.5	4.8 [*]	30.5	62.8 [*]	0.5 [*]	1.3	1.3	0.17
広島果研11号	2x	5	12月	167.9	61.1	72.0	117.9	3.7	35.3	78.9	3.8	10.8	10.8	0.23
	4x	5	上旬	175.8	60.6	74.3	122.5	5.0 ^{**}	43.4	70.4 ^{**}	4.0	7.0	7.0	0.19
はれひめ	2x	5	12月	111.0	53.3	66.6	125.3	4.4	34.3	68.9	12.6	5.2	5.2	0.18
	4x	5	上旬	133.8	56.4	70.4	125.3	6.1 ^{**}	57.4 ^{**}	57.2 ^{**}	2.8 [*]	0.4 [*]	0.4 [*]	0.14
道谷系ビラフランカ	2x	5	2月	125.9	77.7	60.1	77.5	5.0	43.2	65.7	14.0	2.4	2.4	—
	4x	3	上旬	193.3	93.3	68.7	74.2	10.3 ^{**}	122.1 ^{**}	37.0 ^{**}	18.3	4.3	4.3	—

^z2x; 二倍性 4x; 四倍性を示す

^y(横径/縦径)×100

^x(果実重-果皮重)/果実重×100

^w不完全種子のうち種子長8 mm以上の種子数

^u** および*はスチューデントのt検定によりそれぞれ1%および5%水準で有意差があることを示す

^u—はデータがないことを示す

第2-8表 コルヒチン処理により作出した2x-4x-4x倍數性キメラの自然受粉による果実特性

品種	個体の 倍數性 ^z	果實數	收穫 時期	果實重 (g)	果實徑 (mm)		果形指數 ^y	果皮厚 (mm)	果皮重 (g)	果肉歩合 ^x (%)	1果当たり種子數		完全 種子重 (g)
					縱徑	横徑					完全	不完全 ^w	
土佐文旦	2x	5	2月	372.4	83.3	104.9	126.1	8.4	122.4	67.1	18.0	38.2	0.27
	キメラ	5	上旬	403.9 ^{xy}	86.7	106.2	122.6	9.3 *	140.8 **	65.1	19.0	26.8	0.25
はるか	2x	5	2月	221.4	74.7	81.9	109.6	5.9	75.1	66.1	12.6	25.4	0.12
	キメラ	5	上旬	146.6 **	64.0 **	70.4 **	110.0	6.5	58.4 *	60.4 *	4.0	9.0 **	0.06
安芸タンゴール	2x	5	12月	183.1	62.5	75.7	121.3	3.1	30.6	83.4	9.4	18.4	0.23
	キメラ	5	上旬	126.6 **	58.6	64.5 **	110.2 **	3.6	28.1	77.8 **	7.0	7.6 **	0.10 **
不知火	2x	5	12月	176.2	69.7	72.0	103.5	3.9	43.2	75.5	0.0	0.0	— ^u
	キメラ	5	上旬	228.1 **	79.6	80.4 *	102.4	4.0	60.9 *	73.5	3.8 *	0.0	0.20
はるみ	2x	5	12月	162.4	62.8	75.9	120.9	3.4	34.3	78.9	3.6	0.6	0.10
	キメラ	5	上旬	141.2	62.0	71.8	115.9	4.1	36.8	74.2 *	0.4	0.0	0.04
広島果研11号	2x	5	12月	167.9	61.1	72.0	117.9	3.7	35.3	78.9	3.8	10.8	0.23
	キメラ	5	上旬	142.2	56.3	69.1	122.8	4.8 *	53.4	70.0 **	4.2	1.2 **	0.27
はれひめ	2x	5	12月	111.0	53.3	66.6	125.3	4.4	34.3	68.9	12.6	5.2	0.18
	キメラ	5	上旬	146.4 *	60.2 **	71.9	119.4	5.5 **	54.9 **	62.8 *	3.2 *	0.4 *	0.08 **

^z2x: 二倍性を示す キメラ; 茎頂分裂組織第1層が2x, 第2層が4x, 第3層が4xの2x-4x-4x周縁キメラと推定した個体

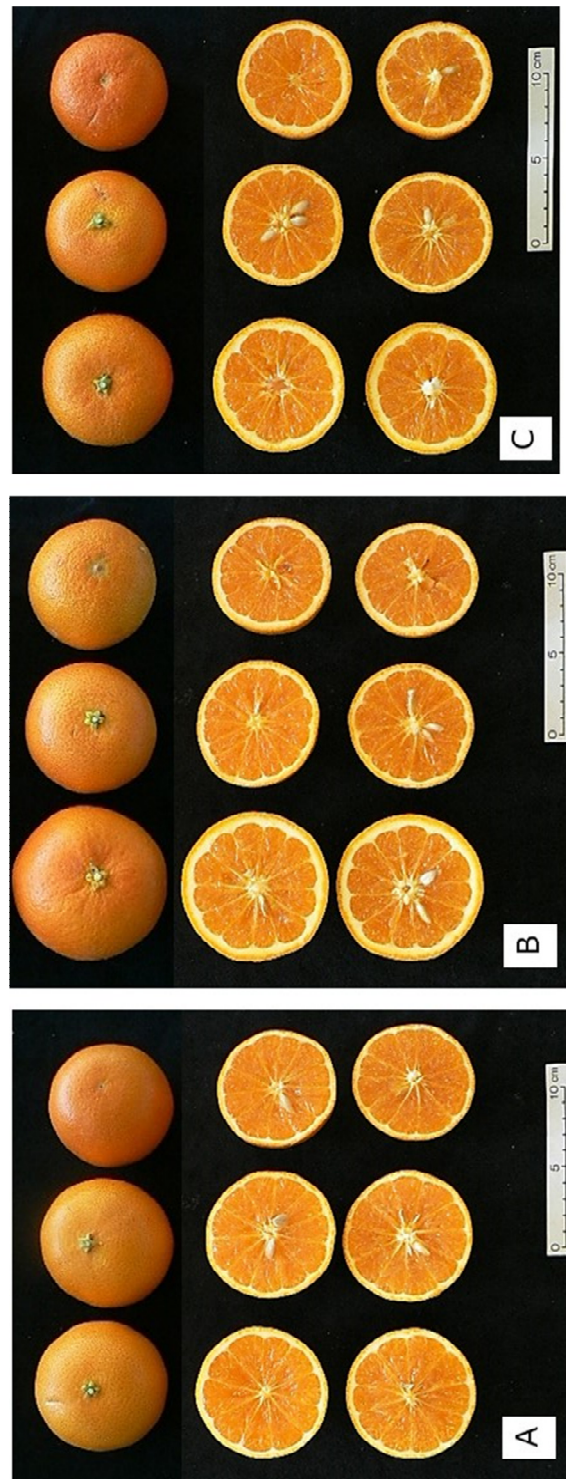
^y(横徑/縱徑)×100

^{xy}(果實重-果皮重)/果實重×100

^w不完全種子のうち種子長8 mm以上の種子數

^{xy**}および^{xy}はステューデントのt検定によりそれぞれ1%および5%水準で有意差があることを示す

^u—は種子がなく、データがないことを示す



第2-5図 ‘広島果研11号’の果実
A: 二倍体 B: 四倍体 C: 2x-4x-4x 倍数性キメラ

第 3 章 コルヒチン処理により作出した $2x-4x-4x$ 倍数性キメラの三倍体育種親としての有効性

第 1 章および第 2 章において，コルヒチン処理により作出した倍数性キメラの葉は，二倍体の葉と比較して有意に厚く，花粉粒は二倍体と比較して有意に大きく，四倍体と同様の形質を示した．また，果実組織において，表皮を含む果皮，じょうのう膜，さじょうの倍数性は二倍性と四倍性が混在し，表皮を含まないフラベドとアルベドは四倍性を示した．花粉は四倍体と同様に二倍性と四倍性を示した．これらの形態的特性と倍数性から，これらの倍数性キメラは，L1 が二倍性，L2 と L3 が四倍性の $2x-4x-4x$ 倍数性キメラであることが明らかになった．そこで，ここでは， $2x-4x-4x$ 倍数性キメラを種子親あるいは花粉親とした交配を行い，得られた果実での種子形成および実生の倍数性を調査して， $2x-4x-4x$ 倍数性キメラの三倍体育種親としての有効性を明らかにした．

第 1 節 $2x-4x-4x$ 倍数性キメラの種子親としての有効性

材料および方法

広島県立総合技術研究所農業技術センター果樹研究部（東広島市安芸津町）の無加温ガラス室にて 45～60 L ポットで育成中の単胚性 $2x-4x-4x$ 倍数性キメラおよび四倍体を種子親，二倍体を花粉親として第 3-1 表の組合せで交配を行った．なお，この交配に用いた ‘Siamese Acidless’ [*C.maxima* (Burm) Merr.] (JP118407) は，国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹茶業研究部門より分譲を受けた無酸ブンタンである．交配によって得られた完全種子数および不完全種子数を測定し，完全種子は外種皮および内種皮を取除いてバーミキュライトに播種して 25℃，12 時間日長の培養室で育苗した．不完全種子は，0.5% アンチホルミンで 15 分間滅菌し，滅菌水で 4 回洗浄した後，クリーンベンチ内で外種皮および内種皮を除去し，胚を 1/2 濃度の MS 培地（ショ糖 3%，ゲルライト

1%) に置床した。発芽発根した個体は同組成のゲルライト 0.2% 培地に移植して生育を促した。生育した実生の倍数性は、播種後 5 ヶ月を経過した苗の葉を用いて、フローサイトメトリーにより第 1 章第 1 節と同様の方法あるいは、得られた種子をシャーレ内あるいは培地上で発芽・発根を促し、約 1 cm 発根した時の根端を採取し、押しつぶし法による染色体数調査により判定した。

結果

2x-4x-4x 倍数性キメラを種子親、二倍体を花粉親とした交配において、得られた完全種子は 1 果実あたり 1.2~7 個、不完全種子は 1 果実あたり 0.1~23.5 個であった (第 3-1 表)。完全種子からの実生獲得率は、41~80% であった。一方、不完全種子は、種子中の小さな胚 (第 3-1 図) を培養すると発芽・発根し、実生獲得率は 2% であった。完全種子および不完全種子を合わせた 1 果実あたりの三倍体獲得数は、1.0~5.0 個体であった。

同一品種の四倍体を種子親とした交配と比較した 3 品種では、1 果実あたりの完全種子および不完全種子の獲得数は 2x-4x-4x 倍数性キメラと四倍体とで同等であった。また、いずれの交配組合せにおいても、実生の倍数性は、完全種子由来、不完全種子由来ともにすべて三倍体であった。

第 2 節 2x-4x-4x 倍数性キメラの花粉親としての有効性

材料および方法

同センター果樹研究部三原分室 (三原市木原町) の露地圃場植栽の二倍体を種子親、2x-4x-4x 倍数性キメラおよび四倍体を花粉親として第 3-2 表の組合せで交配を行った。交配によって得られた完全種子および不完全種子は、第 3 章第 1 節と同様な方法で、シャーレ内あるいは培地上で発芽・発根を促し、根端の染色体数を調査した。

結果

二倍体を種子親， $2x-4x-4x$ 倍数性キメラを花粉親とした 4 組み合わせの交配における種子形成は，完全種子が 1 果実あたり 0～0.2 個と少なく，不完全種子が 1 果実あたり 3.2～8.6 個と多かった（第 3-2 表）。いずれの組合せにおいても，得られた完全種子からの実生獲得率は 100% で，二倍体（第 3-2 図 A）あるいは四倍体（第 3-2 図 C）であった。得られた不完全種子からの実生獲得率は，5～11% で低かったが，すべて三倍体（第 3-2 図 B）であった。1 果実当たりの三倍体獲得数は，0.4～0.5 個体であった。

第 3 節 考察

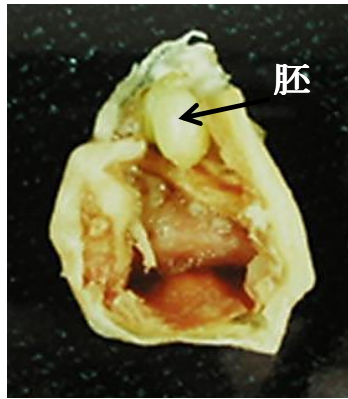
三倍体の育成において，四倍体を種子親として二倍体を花粉親とした交配では，二倍体を種子親として四倍体を花粉親とした交配よりも完全種子を多く獲得でき（Esen ら，1978；八幡，2003），種子親に四倍体単胚性品種を用いると，得られた実生はすべて雑種実生であるため，効率よく三倍体を得られることが報告されている

（Aleza ら，2012；金好ら，2008）。本研究では，単胚性 $2x-4x-4x$ 倍数性キメラを種子親として二倍体との交配で得られた実生は，すべて三倍体であり，四倍体を種子親として二倍体を交配した報告と一致した。また，二倍体を種子親として四倍体を交配すると，得られる完全種子は二倍体，あるいは四倍体であることが多く，不完全種子がすべて三倍体であり，不完全種子中の胚は，人工培地で培養することで実生が得られることが報告されている（金好ら，1997；Oiyama ら，1991；Starrantino and Recupero，1981）。本研究でも，二倍体を種子親として $2x-4x-4x$ 倍数性キメラを交配して得られた完全種子は二倍体と四倍体で，不完全種子がすべて三倍体であった。以上のとおり，本研究における $2x-4x-4x$ 倍数性キメラを交配親として二倍体を交配した場合の種子形成や実生の倍数性は，四倍体を交配親として二倍体を交配した報告とほぼ同様の結果であった。このことから， $2x-4x-4x$ 倍数性キメラは，三倍体育成の種子親および花粉親として，四倍体と同様に有効であることが明らかとなった。

2x-4x-4x 倍数性キメラは，有用な育種素材であるが，生育中に倍数性構造が変化することがあり，倍数性キメラを育種親として利用するには，定期的な倍数性調査が必要である．

第 4 節 摘要

2x-4x-4x 倍数性キメラを種子親として二倍体と交配した結果，得られた完全種子は 1 果実あたり 1.2～7 個，不完全種子は 1 果実あたり 0.1～23.5 個であった．完全種子からの実生獲得率は，41～80%，不完全種子からの実生獲得率は 2% で，得られた実生は完全種子，不完全種子のいずれもすべて三倍体であった．1 果実あたりの三倍体獲得数は，1～5 個体であった．2x-4x-4x 倍数性キメラを花粉親として二倍体と交配した場合は，得られた完全種子は 1 果実あたり 0～0.2 個，不完全種子は 3.2～8.6 個であった．完全種子からの実生獲得率は 100%，不完全種子からの実生獲得率は 5～11% であった．完全種子から得られた実生は二倍体あるいは四倍体で，不完全種子から得られた実生はすべて三倍体であった．1 果実あたりの三倍体獲得数は，0.4～0.5 個体であった．以上より，2x-4x-4x 倍数性キメラは，四倍体と同様に，三倍体育成の交配親として有効であることが明らかとなった．



第 3-1 図 不完全種子の胚



第 3-2 図 押しつぶし法による染色体の観察

A : 二倍体 ($2n=2x=18$) B : 三倍体 ($2n=3x=27$) C : 四倍体 ($2n=4x=36$)

第3-1表 コルヒチン処理により作出した2x-4x-4x倍数性キメラおよび四倍体を種子親とした交配の種子形成と実生の倍数性

種子親	花粉親	調査 果実数	獲得種子数		1果あたり種子数		獲得実生数(率%)		倍数性別実生数 ^y				1果あたり 獲得 三倍体数	
			完全	不完全 ^z	完全	不完全	完全種子 由来	不完全種子 由来	完全種子由来		不完全 種子由来			
									2x	3x	4x	3x		
四倍体 農間紅八朔	二倍体 大橘	7	15	24	2.1	3.4	8 (54)	0	0	0	8	0	—	1.1
キメラ ^x 農間紅八朔	二倍体 大橘	5	23	10	4.6	2.0	0	0	— ^v	—	—	—	—	0.0
四倍体 安芸タンゴール	二倍体 Siamese Acidless ^w	1	7	3	7.0	3.0	5 (71)	0	0	0	5 ^u	0	—	5.0
	二倍体 大橘	22	77	79	3.5	3.6	66 (86)	0	0	0	66	0	—	3.0
キメラ 安芸タンゴール	二倍体 大橘	31	121	96	3.9	3.1	49 (41)	0	0	0	49	0	—	1.6
四倍体 広島果研11号	二倍体 Siamese Acidless	5	6	63	1.2	12.6	4 (67)	1 (2)	0	0	4 ^u	0	1 ^u	1.0
	二倍体 大橘	5	14	104	2.7	20.7	10 (74)	0	0	0	10	0	—	2.0
キメラ 広島果研11号	二倍体 大橘	4	11	94	2.8	23.5	9 (80)	0	0	0	9	0	—	2.3
四倍体 水晶プリンタン	二倍体 大橘	15	66	41	4.4	2.7	44 (67)	0	0	0	44	0	—	2.9
四倍体 清見	二倍体 大橘	37	289	15	7.8	0.4	105 (36)	0	0	0	105	0	—	2.8
四倍体 おりあけ	二倍体 大橘	12	4	8	0.3	0.7	3 (75)	5 (63)	0	0	3	0	5	0.3
キメラ はれひめ	二倍体 大橘	14	64	1	4.6	0.1	29 (45)	0	0	0	29	0	—	2.1

^y不完全種子のうち種子長8 mm以上の種子数

^z実生の葉の倍数性をフローサイトメリーで測定 2x;二倍性 3x;三倍性 4x;四倍性を示す

^g茎頂分裂組織第1層が2x、第2層が4x、第3層が4xの2x-4x-4x周縁キメラと推定した個体

^w国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹茶業研究部門より分譲を受けた無酸プリンタン; JP118407

^v—は実生が得られず調査ができなかったことを示す

^u発芽直後の根端細胞を押しつぶし法により染色体数を観察した

第3-2表 コルヒチン処理により作出した2x-4x-4x倍数性キメラを花粉親とした交配の種子形成と実生の倍数性

種子親	花粉親	調査 果実数	獲得種子数		1果実あたり種子数		獲得実生数(率%)		倍数性別実生数 ^y					1果実あたり 獲得 三倍体数
			完全	不完全 ^z	完全	不完全	完全種子 由来	不完全種子 由来	完全種子由来		不完全 種子由来			
									2x	3x	4x	3x		
二倍体 水晶文旦	キメラ ^x 不知火	2	0	9	0.0	4.5	0	1 (11)	N.D. ^v	N.D.	N.D.	1	0.5	
二倍体 大橘 ^w	キメラ 不知火	50	8	387	0.2	7.7	8 (100)	26 (7)	7	0	1	26	0.5	
二倍体 農間紅八朔	キメラ 不知火	5	1	16	0.2	3.2	0	0	— ^u	—	—	—	—	
二倍体 清見	キメラ 安政柑	75	4	648	0.1	8.6	4 (100)	30 (5)	0	0	4	30	0.4	
二倍体 清見 ^w	四倍体大橘	31	2	114	0.1	3.7	2 (100)	3 (3)	0	2	0	3	0.2	
二倍体 西之香	四倍体大橘	19	2	48	0.1	2.5	2 (100)	7 (15)	0	1	1	7	0.4	

^z不完全種子のうち種子長8 mm以上の種子数

^y発芽直後の根端細胞を押しつぶし法により染色体数を観察した 2x; 二倍性 3x; 三倍性 4x; 四倍性を示す

^x茎頂分裂組織第1層が2x, 第2層が4x, 第3層が4xの2x-4x-4x周縁キメラと推定した個体

^w金好ら(2002)より引用

^yN.D.は種子が無かったことを示す

^u—は実生が得られず調査ができなかったことを示す

第 4 章 成熟種子に残存する胚乳の倍数性にに基づく胚および配偶子の倍数性推定

第 1 章，第 2 章および第 3 章では，三倍体育成の交配親となる四倍体および $2x-4x-4x$ 倍数性キメラの作出とその選抜の効率化について明らかにした．これらの倍数体を利用した交雑では，目的とする三倍体以外の倍数体が得られる場合がある．二倍体×四倍体では，三倍体以外に二倍体，四倍体（金好ら，1997；立川ら，1961；八幡ら，2003）および六倍体が出現することがある（Esen・Soost, 1972, 1973；生山，1992）．四倍体×二倍体では，多胚性品種を種子親とすると，三倍体と四倍体が混在して出現し（Esen ら，1978；生山，1992；立川ら，1961；八幡ら，2003），単胚性品種を種子親としても三倍体以外に五倍体が出現する事例がある（Aleza ら，2012；金好ら，2008）．また，二倍体間交雑で生じる小粒種子から得られる三倍体の獲得率は品種によって異なり，‘土佐文旦’および‘水晶文旦’の 2.4%（山榮ら，1996）から，レモン類の 8.0～25.0%（柳本・金好，2017）と幅広い．したがって，三倍体交雑実生の選抜には倍数性判定が必要である．その方法には，根端の染色体数の観察や（生山ら，1992），フローサイトメトリーによる倍数性測定がある（春崎ら，2000；上曾山ら，2000）．しかし，いずれの方法も，交雑により得られた種子を播種し，倍数性判定を行うまで育苗する必要がある，育苗スペース，管理労力を要する．播種前に種子の胚の倍数性を判定すれば，効率よく目的の倍数体のみを選抜することができるが，胚を傷つけると発芽や生育に影響を及ぼす可能性がある．

一方，本研究において，第 1 章でコルヒチン処理によって作出した $2x-4x-4x$ 倍数性キメラを用いて，各組織が由来する茎頂分裂組織層の調査を行う中で，成熟果実の種子組織の倍数性調査において，胚が二倍体の場合，内種皮は胚乳と同じ三倍体で，従来，退化して消滅すると考えられていた胚乳が，種子中に存在している可能性を見出した．そこで，ここでは，種子の発育過程における胚乳や内種

皮などの構造や倍数性検出の変化を調査し、胚以外の種子組織から、その交雑実生の倍数性や、実生を形成した雌性および雄性配偶子の倍数性を推定できることを明らかにした。

第 1 節 自然交雑で得られた完全種子の組織別倍数性

材料および方法

胚の倍数性と内種皮の倍数性の関係を明らかにするため、カンキツの自然交雑で得られた完全種子について、組織別の倍数性調査を行った。供試した品種は、広島県立総合技術研究所農業技術センター果樹研究部（東広島市安芸津町）の無加温ガラス室にて 45～60 L ポットで育成中の、第 4-1 表に示した‘大橘’，‘土佐文旦’，‘農間紅八朔’，‘広島果研 11 号’，‘安芸タンゴール’および‘はれひめ’の二倍体，四倍体あるいは $2x-4x-4x$ 倍数性キメラとした。これらの品種はいずれも単胚性である。2012 年 12 月に自然交雑により得られた果実を、各個体あたり 3 果ずつ収穫し、2013 年 3 月から 6 月にかけて、1 果あたり 5～10 個の完全種子を取り出した。種子は、組織別に分解し、このうち胚と内種皮を 5 mm 角の大きさに切り出して、第 1 章と同様の方法でフローサイトメトリーにより倍数性を判定した。

結果

二倍体の自然交雑では、胚が二倍性で内種皮が三倍性を示す完全種子が最も多く得られた（第 4-1 表）。さらに、胚が三倍性で内種皮が四倍性の種子が‘大橘’および‘はれひめ’で、胚が三倍性で内種皮が五倍性の種子が‘安芸タンゴール’および‘はれひめ’で（第 4-1 図 A）、胚が四倍性で内種皮が六倍性の種子が‘大橘’，‘農間紅八朔’（第 4-1 図 B），‘広島果研 11 号’および‘はれひめ’で、胚が六倍性で内種皮が十倍性の種子が‘農間紅八朔’で得られた。四倍体および $2x-4x-4x$ 倍数性キメラでは、胚が三倍性で内種皮が五倍性および胚が四倍性で内種皮が六倍性の種子が多く得られた。また、

胚が四倍性で内種皮が八倍性の種子が四倍体‘農間紅八朔’および‘広島果研 11 号’で（第 4-1 図 C），胚が六倍性で内種皮が十倍性の種子が四倍体‘大橘’，‘農間紅八朔’，‘安芸タンゴール’（第 4-1 図 D）および‘広島果研 11 号’で得られた．これらの結果から，これまで体細胞の倍数性と同一と考えられていた内種皮の倍数性が，種子の胚乳の倍数性と一致することが明らかとなった．

第 2 節 ‘大橘’の自然交雑で得られた完全種子組織の発育過程における倍数性検出の変化

材料および方法

内種皮の倍数性が胚乳の倍数性と一致する要因を明らかにするため，第 1 節の供試品種の中で安定して種子が獲得できる‘大橘’の完全種子について，組織別の倍数性を経時的に調査した．同センター果樹研究部の露地圃場植栽の 9 年生‘大橘’の自然交雑によって得られた果実を，2015 年 7 月から 12 月にかけて，7～9 月は半月ごと，10～12 月は 1 か月ごとに 3 果ずつ採取し，1 果から平均的な大きさの完全種子 3 個を選んで，それぞれ外種皮，内種皮，胚乳および胚の組織別に分解し，第 4 章第 1 節と同様の方法で倍数性を測定した．内種皮は，9 月 10 日から，外種皮に面した薄茶色の膜と胚に面した半透明膜に分別して測定した．さらに，内種皮のカラザ部（第 4-2 図）を切り取り，同様の方法で倍数性を測定した．10 月 29 日以降は，半透明膜の分別は困難となり，薄茶色の膜として測定し，カラザ部は引き続き切り取って測定した．

結果

7 月 31 日に採取した種子は柔らかく，外種皮，内種皮，ゼリー状の胚乳およびハート型胚に分別でき（第 4-3 図 A），外種皮，内種皮および胚は二倍性，胚乳は三倍性であった（第 4-2 表，第 4-4 図）．8 月 14 日に採取した種子では，外種皮，内種皮，胚は二倍性，胚乳は三倍性を示したものが多かったが，内種皮および胚乳で，二倍性

と三倍性が混在するものがあった。8月27日では、胚乳が確認できなくなり（第4-3図B）、内種皮はすべての種子で二倍性と三倍性が混在した（第4-5図）。外種皮および胚は、すべての種子で二倍性を示した。9月10日では、内種皮が外種皮側の薄茶色の膜と胚側の半透明の膜に分別でき（第4-3図C）、薄茶色の膜は多くが二倍性を示し、一部三倍性が混在した。半透明膜は多くが三倍性を示し、一部二倍性が混在した。外種皮および胚は、すべての種子で二倍性を示した。9月25日では、薄茶色の膜は二倍性のみ、二倍性と三倍性の混在、三倍性のみと様々であったが、半透明膜はすべての種子で三倍性のみを示した。外種皮は、7個体で二倍性を示し、2個体で検出できなかった。胚はすべての種子で二倍性を示した。10月29日では内種皮を薄茶色の膜と半透明膜に分別することが困難となり、内種皮の倍数性は多くが三倍性を示したが、一部二倍性が混在した。外種皮および胚は、すべての種子で二倍性を示した。11月27日、12月24日は外種皮が硬化し（第4-3図D）、倍数性を検出できなくなった。内種皮は、三倍性のみを示した（第4-6図A）。胚はすべての種子で二倍性を示した。内種皮のカラザ部の倍数性は、9月10日から10月29日まではすべての種子で二倍性を示し、11月27日と12月24日は二倍性を示すものと検出できないものが出現した（第4-6図B）。

第3節 内種皮の倍数性に基づく交雑実生の倍数性の推定と検証 材料および方法

交雑によって得られた完全種子の内種皮の倍数性から胚および配偶子の倍数性を推定し、これを確認するため、実生の倍数性を調査した。2016年4月に、同センター果樹研究部の無加温ガラス室で育成中の四倍体‘大橘’、四倍体‘水晶文旦’、および二倍体‘大橘’を種子親、二倍体‘黄金柑’〔*C.flaviculpus hort.ex Tanaka*〕を花粉親とした交配と四倍体‘大橘’の自家受粉を行った。同年10月に果実を収穫し、得られた完全種子の内種皮の倍数性を第4章第2節と

同様の方法で測定して胚および配偶子の倍数性を推定した．外種皮および内種皮を除去し，胚をバーミキュライトに播種して育苗し，2017年6月に個体の葉の倍数性を第1章第1節と同様の方法で測定した．

結果

二倍体‘大橘’を種子親とし，二倍体‘黄金柑’を花粉親とした交配では，得られた17個の完全種子において，すべての内種皮の倍数性が三倍性であったので，この交雑の配偶子は，両方とも正常な減数分裂による還元性配偶子で，その胚は二倍性と推定した（第4-3表）．生育した17個体の葉はすべて二倍性であった．四倍体‘大橘’を種子親とし，二倍体‘黄金柑’を花粉親とした交配では，得られた10個の完全種子において，すべての内種皮の倍数性は五倍性であったので，この交雑の両配偶子は，どちらも還元性配偶子で，その胚の倍数性はすべて三倍性と推定した．このうち生育した9個体の葉の倍数性はすべて三倍性であった．四倍体‘大橘’の自家受粉では，得られた24個の完全種子において，内種皮の倍数性が六倍性を示し，4個の完全種子において，内種皮の倍数性が四倍性と六倍性の両方を示したので，この交雑の配偶子は，両方とも還元性配偶子で，その胚は四倍性と推定した．そのうちそれぞれ生育した19個体および1個体の葉の倍数性はすべて四倍性であった．その他，内種皮の倍数性が八倍性を示した完全種子が1個，四倍性と八倍性を示した完全種子が1個得られ，どちらも雄性配偶子が非還元性，胚は六倍性と推定したが，いずれも枯死した．四倍体‘水晶文旦’を種子親とし，二倍体‘黄金柑’を花粉親とした交配では，得られた5個の完全種子において，内種皮の倍数性が五倍性を示したので，この交雑の配偶子は両者とも還元性で，その胚は三倍性と推定した．これらはすべて生育し，葉の倍数性はすべて三倍性であった．また内種皮が四倍性と六倍性を示した完全種子が1個得られ，この交雑の配偶子は雄性配偶子が非還元性で，胚は四倍性と推定した．生育

した個体の葉は四倍性であった．

第 4 節 考察

無胚乳種子を形成するカンキツ類は，重複受精により胚と胚乳を形成するが，この胚乳は，胚の生育の栄養源として胚の成長とともに退化して消滅すると考えられている（岩政，1999）．また，無胚乳種子の内種皮および外種皮は胚珠の珠皮由来で，その倍数性は種子親の体細胞と同一になると考えられている（原，1994）．しかし，本研究において，単胚性カンキツ品種の自然交雑による成熟果実から得られた完全種子の組織別の倍数性を測定した結果，内種皮の倍数性が胚乳の倍数性と一致することが明らかとなった．そこで，‘大橘’の種子の発育過程における種子組織の倍数性検出結果の変化から，その要因を考察した．胚乳は 8 月 14 日までは確認でき，三倍性を示したが，8 月 27 日には退化していた．このとき，これまで二倍性を示していた内種皮は，すべての種子で二倍性と三倍性が混在していた．9 月 10 日では，この内種皮が外種皮側の薄茶色の膜と胚側の半透明膜の二層に分別できることが判明し，多くの種子で薄茶色の膜が二倍性，半透明膜が三倍性を示した．これらのことから，三倍性を示した半透明の膜は残存する胚乳組織であり，胚乳は胚の成長とともに退化するが消滅するのではなく，膜状化して胚を包んだ状態になっていると考えられた．10 月 29 日には内種皮を薄茶色の膜と半透明膜に分別することが困難となり，その倍数性は三倍性のみを示すものが多くなった．11 月 27 日以降は内種皮の倍数性はすべての種子で三倍性のみを示し，同時に外種皮は硬化し，倍数性を検出できなくなった．これらのことから，果実が成熟してくる 11 月末～12 月にかけて，種子の外種皮および本来の内種皮は硬化して倍数性の検出が困難となるが，半透明の膜状となって内種皮と一体化した胚乳は倍数性の検出が可能であるため，従来，内種皮と考えられてきた，内種皮とその内側に残存する膜状の胚乳が一体化した組織の倍数性が，胚乳の倍数性と一致したと考えられた．このことから，

カンキツの成熟種子において、これまで内種皮と考えられていた組織は、内種皮と膜状となった胚乳が一体化した組織であり、これをここでは ISE (Inner Seed coat with Endosperm) 種皮と仮称することとした。一方、カラザ部は、9 月 10 日から 10 月 29 日までは二倍性を示し、11 月 27 日からは倍数性を検出できないものが現れた。これらのことから、膜状化した胚乳は、胚全体を覆っているのではなく、カラザ部の内側には残存していないと考えられた。無胚乳種子では、胚乳は胚の生育とともに退化して消滅するとされているが(岩政, 1999)、ゴマの種子では、胚乳が種皮と子葉の間に層として残存し、この組織は三倍性であることが報告されている(小林, 1986; 鈴木, 2003)。本研究により、カンキツ類では、カラザ部を除く内種皮の内側に、胚乳が膜状になって一体化することが明らかとなり、ゴマと同様に、内種皮の内側に膜状化した胚乳が残存していると考えられた。また、カラザ部は、胚の発達過程における栄養補給に係る役割を果たしているとされている(岩政, 1999)。このカラザ部の構造と機能が、カラザ部の内側に膜状化した胚乳が残存しないことに関連すると推察されるが、これらの要因の解明には、胚珠から種子に発達する過程における種子組織の構造の変化等を詳細に調査する必要がある。

カンキツでは、二倍体間の交雑で生じる小粒種子から三倍体が発現することや(Esen・Soost, 1971; 生山・奥代, 1983; 楊ら, 2002)、二倍体を種子親とした四倍体との交雑から得られる完全種子から、四倍体および六倍体が発現すること(Esen・Soost, 1972, 1973)が報告されている。これらの現象は、減数分裂の異常により配偶子が非還元化することに起因するとされており、雌性、雄性どちらの配偶子が非還元化したのかは、SSR マーカーなどによる DNA 解析(中野ら, 2012)や、染色体構成(楊ら, 2002)に基づき判定されているが、これらの解析では判定できる大きさまで実生を育成する必要がある。一方で、本報告において、成熟種子の ISE 種皮と胚乳の倍数性が一致する知見が得られたことから、播種前に ISE 種皮の倍数

性を調査すれば、胚および配偶子の倍数性を推定することができると考えられた。例えば、種子親が四倍体、花粉親が二倍体の交配において、ISE 種皮が五倍性の種子が出現した場合、この種子の胚乳は五倍性であるので、中央細胞の倍数性は四倍性、卵細胞は二倍性、精細胞は半数性で、雌性配偶子と雄性配偶子は還元性、胚は三倍性と推定できる（第 4-7 図 A）。また、同様の交配において、ISE 種皮が六倍性の種子が出現した場合、この種子の胚乳は六倍性であるので、中央細胞の倍数性は四倍性、卵細胞は二倍性、精細胞は二倍性で、雄性配偶子が非還元性、胚は四倍性と推定される（第 4-7 図 B）。さらに、同様の交配において、ISE 種皮が九倍性の種子が出現した場合、この種子の胚乳は九倍性であるので、中央細胞の倍数性は八倍性、卵細胞は四倍性、精細胞は半数性で、雌性配偶子が非還元性、胚は五倍性と推定される（第 4-7 図 C）。これらのことを確認するため、交配によって得られた、成熟した完全種子の内種皮（ISE 種皮）の倍数性を播種前に調査し、その胚の倍数性を推定して、育成後の実生の葉を用いて倍数性を確認したところ、推定値と実測値は一致した（第 4-3 表）。したがって、ISE 種皮の倍数性から、得られた種子の胚の倍数性と配偶子の倍数性を推定できることが明らかになった。この他の倍数性について、ISE 種皮の倍数性から推定される胚および配偶子の倍数性について第 4-4 表に示した。このうち、種子親が二倍体で二重非還元性配偶子を形成し、花粉親が四倍体で還元性配偶子を形成したと推定した事例は、Esen・Soost（1972）でも報告されており、第 4-1 表の二倍体‘農間紅八朔’の自然交雑から生じた胚が六倍性で内種皮（ISE 種皮）が十倍性の種子に相当すると考えられた。また、第 4-1 表の四倍体‘農間紅八朔’および四倍体‘広島果研 11 号’の自然交雑から生じた、胚が四倍性で内種皮（ISE 種皮）が八倍性の種子の起因は二通り考えられた。一つは、種子親が四倍体で、卵細胞は還元性配偶子、中央細胞の一方の極核は還元性配偶子、もう一方は非還元性配偶子を形成し、花粉親が四倍体で還元性配偶子を形成したと推定したものである（第 4-4 表）。配偶子

の非還元化現象により卵細胞と中央細胞の倍数性が異なる事例は、カキで報告されているが (Yamada・Tao, 2007), カンキツでの報告はなく、中央細胞の 2 つの極核がそれぞれ異なる倍数性となる事例も報告されていない。しかし、胚のう細胞の 3 回の分裂において、非還元性配偶子と還元性配偶子が形成され、2 つの極核が異なる倍数性となる可能性があるかと推察した。もう一つは、種子親が四倍体で非還元性配偶子を形成し、その配偶子の単為発生によって胚および胚乳を形成したと推定したものである(第 4-4 表)。カンキツでは、二倍体間の交配において半数体ができることが報告されている (Toolapong, 1996)。また、二倍体クレメンティンと三倍体の交配により得られた 2 個体の半数性について、核リボソーム RNA 遺伝子および葉緑体 DNA を分析した結果、これらの半数体はいずれも種子親由来であることが報告されている (Oiyama・Kobayashi, 1993)。このように、カンキツでは雌性配偶子由来による単為発生の事例が報告されており、非還元性雌性配偶子においても同様な現象が起こり得ると推察した。

以上より、カンキツの種子においては、退化して消滅すると考えられていた胚乳が、半透明の膜状となってカラザ部を除く内種皮の内側に残存し、従来、内種皮と考えられていた組織は、内種皮とこの膜状となった胚乳が一体化した組織 (ISE 種皮) であることが明らかとなった。さらに、果実の成熟とともに、内種皮の倍数性は検出できなくなるが、胚乳の倍数性は検出されるため、ISE 種皮の倍数性が胚乳の倍数性と一致することも明らかとなった。果実成熟期から、カラザ部を除いた ISE 種皮の倍数性を測定することで、胚およびその配偶子の倍数性をほぼ推定できることから、このことを利用すれば、交雑で得られた種子を播種する前に、胚を傷つけずに目的の倍数体を選抜でき、倍数性交雑実生の育成を大幅に効率化できると考えられた。

第 5 節 摘要

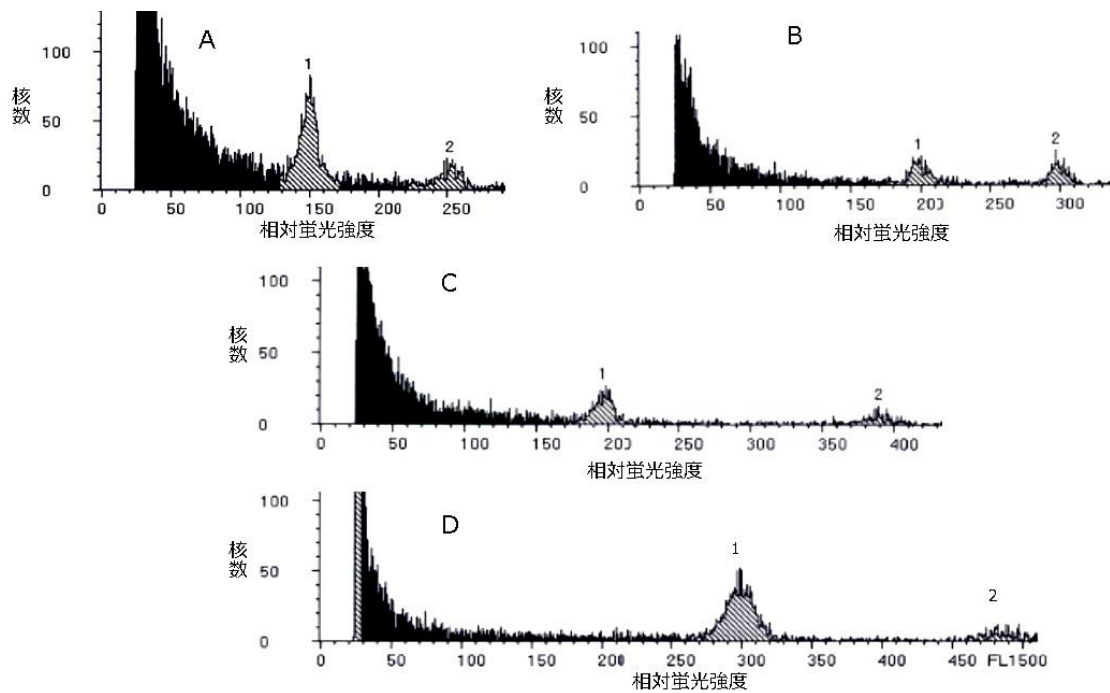
カンキツの交雑で得られた成熟果実の完全種子において、組織別に倍数性を調査した結果、内種皮の倍数性は胚乳の倍数性と一致した。そこで、二倍体‘大橘’の自然交雑で得られた種子について、種子組織に分解して経時的に倍数性を調査した結果、胚乳は三倍性で、8月中旬までゼリー状であったが、8月下旬以降は膜状化して、カラザ部を除いた内種皮内側に存在していることが明らかとなった。10月下旬には膜状となった胚乳は内種皮と一体化し、二倍性を示していた外種皮と内種皮は、種子の成熟とともに倍数性の検出ができなくなった。一方で、三倍性を示す胚乳は、10月下旬以降でも倍数性が検出されたため、成熟種子の内種皮とされていた組織の倍数性は胚乳の倍数性と一致した。従来、内種皮と考えられていた組織は、内種皮と胚乳が一体化した組織であり、この組織の倍数性を測定することで、胚を傷つけることなく胚およびその配偶子の倍数性を推定できることが明らかとなった。また、このことを利用することにより、三倍体の育成効率が大きく向上すると考えられた。

第4-1表 カンキツの自然交雑で得られた完全種子の組織別倍数性

種子親		倍数性別種子の出現個数 ^{zy}							
品種	倍数性 ^y	胚2x 内種皮3x	胚3x 内種皮4x	胚3x 内種皮5x	胚4x 内種皮6x	胚4x 内種皮8x	胚6x 内種皮10x		
大橘	2x	21	1		1				
	4x			13	18		1		
農間紅八朔	2x	12			3		1		
	4x			1	18	1	4		
安芸タンゴール	2x	22		1					
	4x			3	9		1		
土佐文旦	2x	28							
	キメラ			1	30				
広島果研11号	2x	15			2				
	4x			2	4	1	3		
	キメラ			1	2				
	2x	23	2	4	1				
はれひめ	4x			5	1				
	キメラ			3	5				

^y倍数性は、フローサイトメトリーで測定した

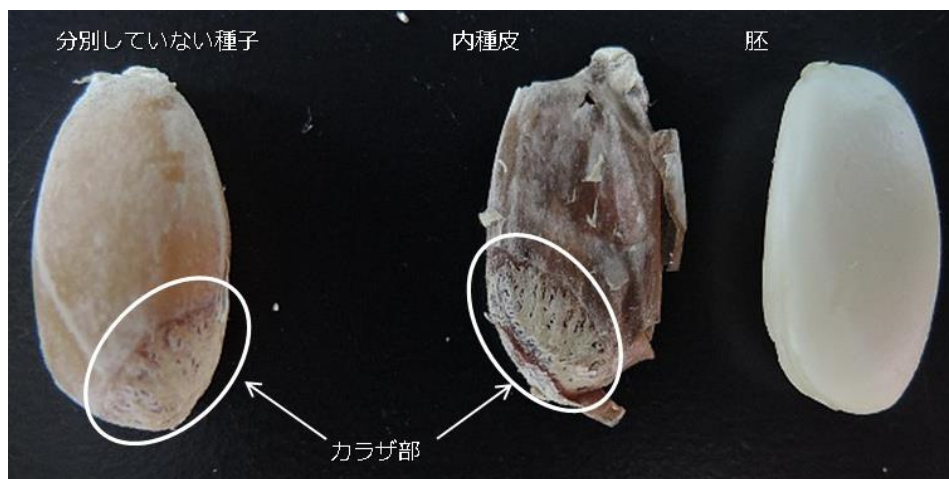
^z2x; 二倍性 3x; 三倍性 4x; 四倍性 5x; 五倍性 6x; 六倍性 8x; 八倍性 10x; 十倍性を示す キメラ; 基頂分裂組織第1層が2x, 第2層が4x, 第3層が4xの2x-4x-4x周縁キメラと推定した個体



第 4-1 図 自然交雑で得られた種子の組織別倍数性

A 二倍体 ‘はれひめ’	ピーク 1：胚（三倍性）	ピーク 2：内種皮（五倍性）
B 二倍体 ‘農間紅八朔’	ピーク 1：胚（四倍性）	ピーク 2：内種皮（六倍性）
C 四倍体 ‘広島果研 11 号’	ピーク 1：胚（四倍性）	ピーク 2：内種皮（八倍性）
D 四倍体 ‘安芸タンゴール’	ピーク 1：胚（六倍性）	ピーク 2：内種皮（十倍性）

※種子の胚と内種皮を混合して測定した



第 4-2 図 ‘大橋’ の種子のカラザ部

第4-2表 ‘大橘’における種子組織の倍数性の変化

種子組織	倍数性別出現種子数 ^z											
	7月31日				8月14日				8月27日			
	2x	2x,3x	3x	N.D. ^y	2x	2x,3x	3x	N.D.	2x	2x,3x	3x	N.D.
外種皮	9	0	0	0	9	0	0	0	9	0	0	0
内種皮 ^x (薄茶色)	9	0	0	0	6	3	0	0	0	9	0	0
内種皮 ^x (半透明)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
内種皮 (カラザ部)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
胚乳 ^w	0	0	9	0	0	1	8	0	—	—	—	—
胚	9	0	0	0	9	0	0	0	9	0	0	0

種子組織	倍数性別出現種子数 ^z											
	9月10日				9月25日				10月29日			
	2x	2x,3x	3x	N.D. ^y	2x	2x,3x	3x	N.D.	2x	2x,3x	3x	N.D.
外種皮	4	0	0	5	7	0	0	2	9	0	0	0
内種皮 ^x (薄茶色)	6	3	0	0	3	4	2	0	0	2	6	1
内種皮 ^x (半透明)	0	1	8	0	0	0	9	0	—	—	—	—
内種皮 (カラザ部)	9	0	0	0	9	0	0	0	9	0	0	0
胚乳 ^w	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
胚	9	0	0	0	9	0	0	0	9	0	0	0

種子組織	倍数性別出現種子数 ^z							
	11月27日				12月24日			
	2x	2x,3x	3x	N.D. ^y	2x	2x,3x	3x	N.D.
外種皮	1	0	0	8	0	0	0	9
内種皮 ^x (薄茶色)	0	0	9	0	0	0	9	0
内種皮 ^x (半透明)	—	—	—	—	—	—	—	—
内種皮 (カラザ部)	5	0	0	4	6	0	0	3
胚乳 ^w	—	—	—	—	—	—	—	—
胚	9	0	0	0	9	0	0	0

^z倍数性は、フローサイトメリーで測定した 2x; 二倍性 3x; 三倍性を示す

^yピークを検出できなかった

^x内種皮は9月10日と9月25日は薄茶色の膜と半透明の膜に分別でき、10月29日以降は分別できなくなった

^w8月14日調査まではゼリー状の胚乳を分別できた



A: 7月31日



B: 8月27日

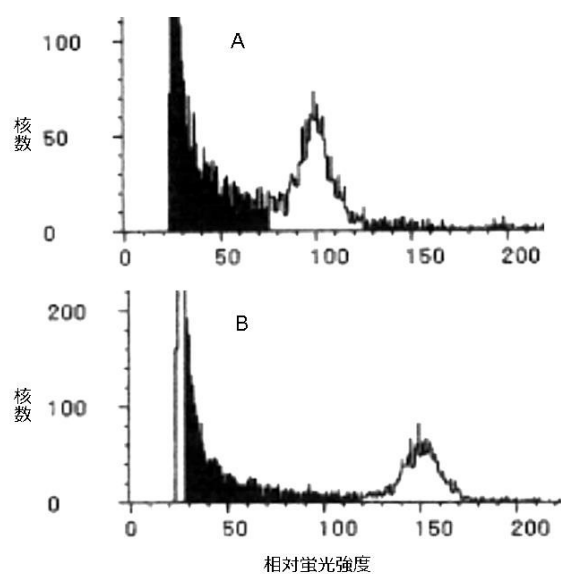


C: 9月10日

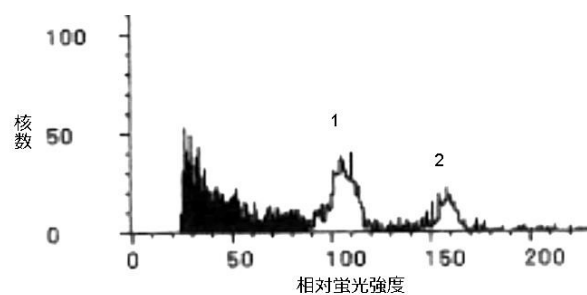


D: 12月24日

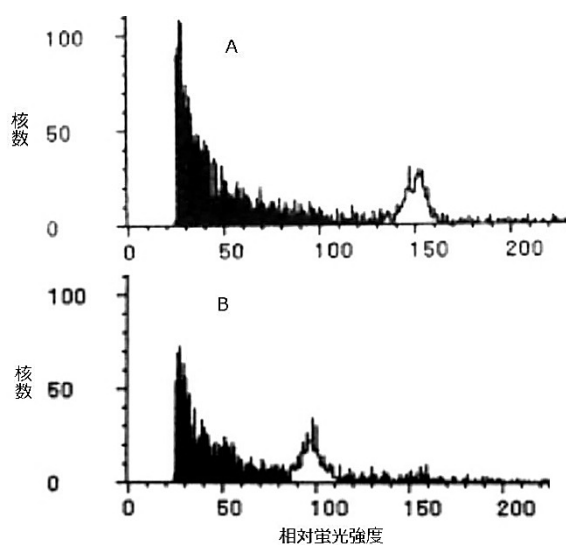
第 4-3 図 組織別に分解した二倍体「大橘」の種子



第 4-4 図 ‘大橘’における 7 月 31 日の種子組織の倍数性
A 内種皮 ピーク：二倍性 B 胚乳 ピーク：三倍性



第 4-5 図 ‘大橘’における 8 月 27 日の内種皮の倍数性
ピーク 1：二倍性 ピーク 2：三倍性



第 4-6 図 ‘大橘’における 12 月 24 日の種子組織の倍数性
A 内種皮 ピーク：三倍性 B カラザ部 ピーク：二倍性

第4-3表 交配で得られた完全種子の内種子の倍数性と実生および配偶子の倍数性の関係

交配組合せ		内種子		推定される配偶子の倍数性 ^y				実生葉	
種子親	花粉親	調査 種子数	倍数性 ^{zy}	配偶子		胚	調査 個体数	倍数性 ^{yx}	
				雌性	雄性				
二倍体 大橘	二倍体 黄金柑	17	3x	x (還元性)	x (還元性)	2x	17	2x	
四倍体 大橘	二倍体 黄金柑	10	5x	2x (還元性)	x (還元性)	3x	9	3x	
四倍体 大橘	四倍体 大橘	24	6x	2x (還元性)	2x (還元性)	4x	19	4x	
		4	4x, 6x	2x (還元性)	2x (還元性)	4x	1	4x	
		1	8x	2x (還元性)	4x (非還元性)	6x	0	— ^w	
		1	4x, 8x	2x (還元性)	4x (非還元性)	6x	0	— ^y	
四倍体 水晶文旦	二倍体 黄金柑	5	5x	2x (還元性)	x (還元性)	3x	5	3x	
		1	4x, 6x	2x (還元性)	2x (非還元性)	4x	1	4x	

^z2016年5月に交配, 10月にフローサイトメリーにより測定した

^y2x; 二倍性 3x; 三倍性 4x; 四倍性 5x; 五倍性 6x; 六倍性 8x; 八倍性を示す

^x2016年10月播種, 2017年6月フローサイトメリーにより測定した

^w発芽しなかった

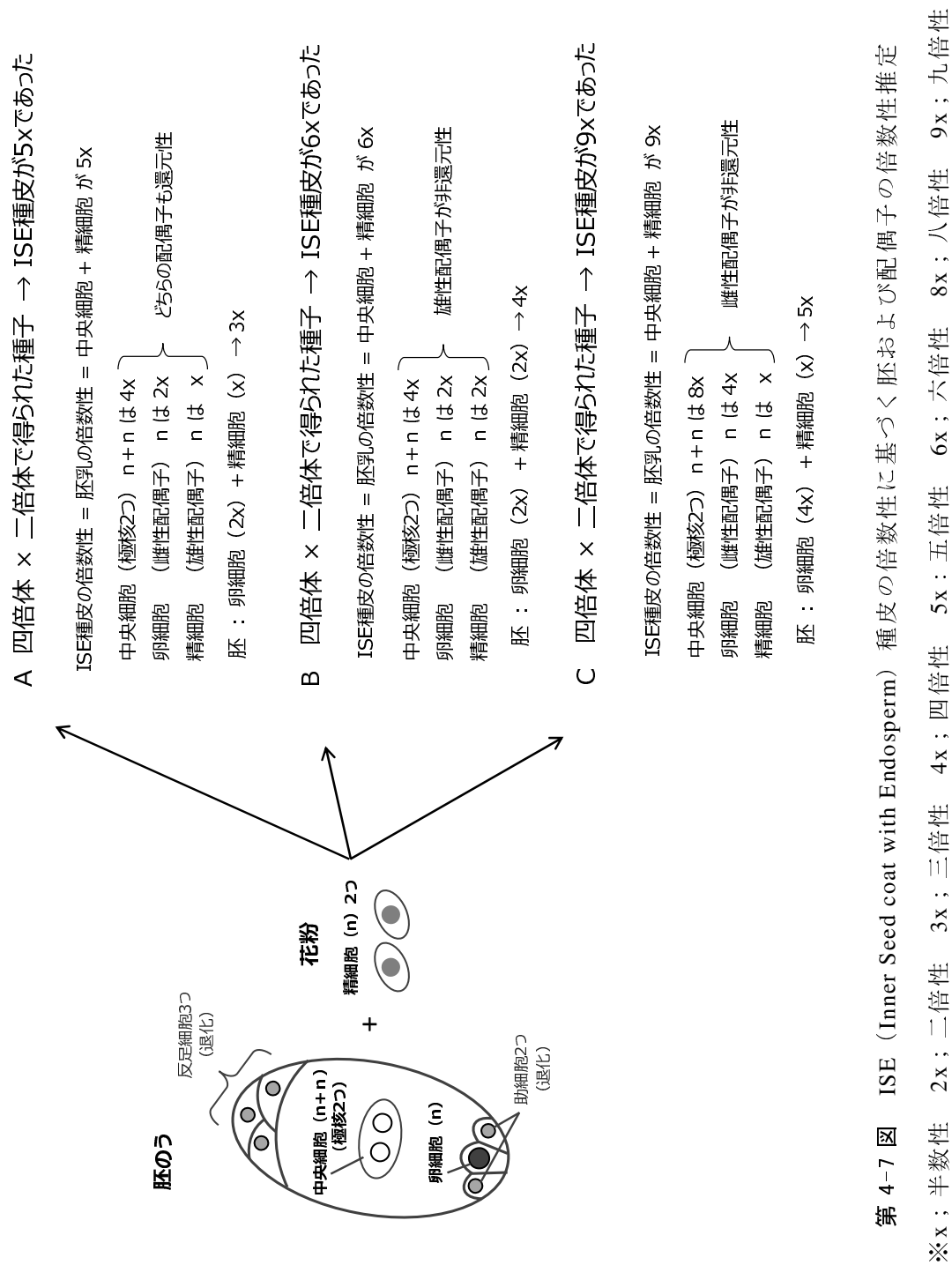
^y生育しなかった

第4-4表 カンキツの二倍体および四倍体の交配で得られる種子の胚と胚乳の倍数性^z

種子親				花粉親			得られる種子	
体細胞	減数分裂	卵細胞	中央細胞 (極核2つ)	体細胞	減数分裂	精細胞	胚 (卵細胞 +精細胞)	胚乳 (中央細胞 +精細胞)
2x	還元	x	2x	2x	還元	x, x	2x	3x
	還元	x	2x		非還元	2x, 2x	3x	4x
	非還元	2x	4x		還元	x, x	3x	5x
	非還元	2x	4x		非還元	2x, 2x	4x	6x
2x	還元	x	2x	4x ^y	還元	2x, 2x	3x	4x
	還元	x	2x		非還元	4x, 4x	5x	6x
	非還元	2x	4x		還元	2x, 2x	4x	6x
	非還元	2x	4x		非還元	4x, 4x	6x	8x
4x ^y	二重非還元	4x	8x	2x	還元	2x, 2x	6x	10x
	還元	2x	4x		還元	x, x	3x	5x
	還元	2x	4x		非還元	2x, 2x	4x	6x
	非還元	4x	8x		還元	x, x	5x	9x
4x ^y	非還元	4x	8x	4x ^y	非還元	2x, 2x	6x	10x
	還元	2x	4x		還元	2x, 2x	4x	6x
	還元	2x	4x		非還元	4x, 4x	6x	8x
	非還元	4x	8x		還元	2x, 2x	6x	10x
4x ^y	非還元	4x	8x	還元, 非還元	非還元	4x, 4x	8x	12x
	還元, 非還元	2x	2x, 4x		還元	2x, 2x	4x	8x
	非還元・単為発生	4x	8x		-	-	4x	8x

^yx: 半数性 2x; 二倍性 3x; 三倍性 4x; 四倍性 5x; 五倍性 6x; 六倍性 8x; 八倍性 9x; 九倍性 10x; 十倍性 12x; 十二倍性を示す

^y2x-4x-4x倍数性キメラも含む



第 4-7 図 ISE (Inner Seed coat with Endosperm) 種皮の倍数性に基づく胚および配偶子の倍数性推定

※ x ; 半数性 2x ; 二倍性 3x ; 三倍性 4x ; 四倍性 5x ; 五倍性 6x ; 六倍性 8x ; 八倍性 9x ; 九倍性

第 5 章 $2x-4x-4x$ 倍数性キメラを交配親として育成した三倍体新品種 ‘黄宝’ の特性

本研究の第 1 章および第 3 章で，コルヒチン処理によって作出された $2x-4x-4x$ 倍数性キメラは，四倍体と同様に三倍体育成の交配親として利用できることを明らかにした．そこで，これらの倍数体を利用した三倍体新品種の開発を行った．広島県では，原産であるハッサクおよび‘安政柑’などのブンタンに由来する品種が特産品として栽培されているが，種子が多く，果皮やじょうのう膜が硬いなどの形質から消費の低迷が続いている．そこで，ブンタン由来の品種に，無核で剥皮し易い形質を付与することを目的とした育種を展開した．この育種では，二倍体と四倍体および $2x-4x-4x$ 倍数性キメラなどの 34 組合せの交配により，約 2000 系統の三倍体を作成した．これらの交配では，保有する約 50 品種のブンタン類遺伝資源から，果実品質などが優れる育種素材 12 品種を選定した．三倍体交雑実生において，無核性ととともに単為結果性を付与できるよう，ブンタン類との交配親として，食味，着果性などに優れる‘不知火’や‘清見’ [*C.unshiu* Marcow. $\times$ *C. sinensis* (L.) Osbeck] などの品種を用いた．この三倍体交雑集団の調査を行った結果，二倍体を種子親， $2x-4x-4x$ 倍数性キメラを花粉親とした後代の中から，果実品質や栽培性に優れる系統が選抜された．ここでは，その三倍体新品種の育成過程と特性について明らかにした．

第 1 節 育成過程

カンキツの交雑育種では，単胚性品種を種子親とすると，得られる実生はすべて交雑個体となるため，育種効率は極めて高い（金好ら，2008）．そこで，ブンタン類で食味が優れる‘大橘’と，無核で単為結果性が強く，剥皮性などの形質が優れる‘不知火’を交配親に選定し，1999 年に二倍体‘大橘’を種子親， $2x-4x-4x$ 倍数性キメラ‘不知火’を花粉親として交配を行った（第 5-1 図）．この交配で

は、得られる実生はすべて交雑個体であるため、得られた不完全種子から胚を取り出して人工培地で培養し（第3章）、約6か月後に腋芽をカラタチに接ぎ木して育苗し、26個体の三倍体を育成した。これらを広島県立総合技術研究所農業技術センター果樹研究部三原分室圃場（広島県三原市木原町）に定植して着果促進を行った。2004年に初結実し、果実品質に優れ、結実良好な系統を選抜した。選抜時の系統名は‘広島柑橘 B30 号’である。次世代検定のため2005年に同圃場植栽の18年生‘足立ネーブル’〔*C.sinensis* (L.) Osbeck var.*brasiliensis* Tanaka〕3樹に高接ぎを行い、栽培特性調査の結果、新品種登録候補に選定した。2008～2009年にかけて、同一樹に高接ぎした‘農間紅八朔’および近隣圃場植栽の‘川野ナツダイダイ’〔*C.natsudaidai* Hayata〕を対照として、農林水産植物種類別審査基準（ブタン類）に基づき樹体、花および果実の調査を実施した。本系統を‘黄宝’（きほう）と命名して、2010年3月4日に品種登録出願し、2013年2月26日に品種登録された。登録番号は第22295号である。なお、英語表記は‘Kihō’を用いる。

第2節 ‘黄宝’の特性

第1項 樹体特性

材料および方法

高接ぎ6年目の2008年11月に、樹冠外周中段の硬化した春枝を各品種10本採取し、枝梢の太さ、とげの発生程度などの形態的特性を対照品種と比較して調査した。また、この枝から1枚ずつ葉を採取し、葉身および翼葉の形態的特性を調査した。

CTV抵抗性については、2009年10月に2年生から4年生までの枝を採取し、これをオートクレーブで120℃、5分間の加圧蒸気処理後、樹皮を剥いでステムピッチング発生程度を調査した。発生程度はカンキツの調査方法（農林水産省、1987）の基準により、無、軽、中、甚に分類し、以下の式で発生度を算出した。

$$\text{発生度} = [(\text{軽の枝数} \times 1) + (\text{中の枝数} \times 3) + (\text{甚の枝数} \times 5)] \\ \div (\text{調査枝数} \times 5) \times 100$$

結果

‘黄宝’の樹姿は、直立性と開張性の中間で、樹勢は強く、枝梢は密に発生した（第 5-1 表，第 5-2 図）。育成地における発芽始期は 4 月上旬で、枝梢の太さは 6.0 mm と対照品種と比較して有意に太く、とげの発生率は 76.2% と対照品種と比較して有意に高かった。葉身長は対照品種と比較して有意に短く、葉は有意に厚く、翼葉は有意に長かった。かんきつかいよう病にはやや強く、隔年結果性は低かった。‘黄宝’のステムピッチングは、2 年生枝 1 本で軽度の発生が見られたが、その他の枝では観察されず、対照の‘農間紅八朔’と比較して発生度は極めて低かった（第 5-2 表）。

第 2 項 花の特性

材料および方法

高接ぎ 6 年目の 2008 年において、5 月に、花卉がほころびかかった開花直前の花蕾を 20 花採取し、花蕾の重さ、花卉の数などの形態的特性を対照品種と比較して調査した。また、2013 年の 4～5 月に開花直前の花蕾 3 花から花粉を採取し、25℃ 10 時間日長に設定した人工気象室内で開葯し、花粉を 1% アセトカーミン液で染色して稔性を調査した。さらに、10% ショ糖を加えた 1% 寒天培地に花粉を置き、25℃ で 5 時間培養して発芽率を調査した。なお、花粉粒径の 3 倍以上に花粉管が伸長したものを発芽花粉とした。

結果

花序は総状で、育成地における開花始期は 5 月中旬、花蕾の重さは 1.0 g で‘農間紅八朔’と同等であるが‘川野ナツダイダイ’と比較して大きく、花卉の数は 4.4 枚で対照 2 品種と比較して有意に少なかった（第 5-3 表）。花粉稔性は 78.3% で‘農間紅八朔’と比較

して有意に低く，発芽率は 1.0% で対照 2 品種と比較して著しく低かった．

第 3 項 果実特性

材料および方法

果実特性は，2009 年 3 月 17 日に樹冠外周中段に結実した平均的な大きさおよび果形の果実 10 果を採取し，8 穴開きの LDPE（穴の直径は 6mm）で個装して常温貯蔵し，同年 4 月 20 日に，果実重，果実径，果肉歩合，種子数，糖度およびクエン酸含量などについて対照品種と比較して調査した．

結果

果実の着色は対照 2 品種よりも早く，10 月下旬から始まり 12 月上旬にはほぼ完全着色した（第 5-4 表）．果実の形は球形で，果梗部に短いネックを生じ，果実の重さは 400g 程度と対照 2 品種と比較して大果で，果皮は鮮やかな黄橙色であった（第 5-3 図）．剥皮性はやや易で，じょうのう膜は柔らかく，完全種子，不完全種子ともほとんど入らない．また，糖度が 13° Brix，クエン酸含量が 1.44% となる 4 下旬以降が成熟期であることが示唆された．

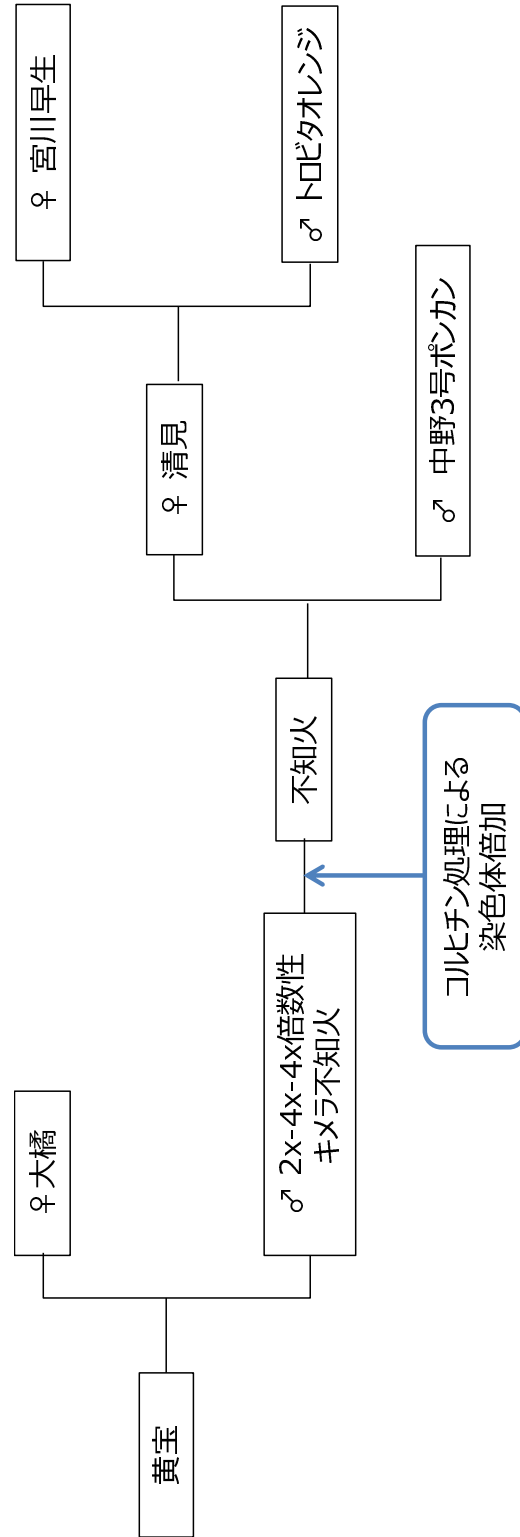
第 3 節 考察

二倍体‘大橘’を種子親，2x-4x-4x 倍数性キメラ‘不知火’を花粉親とした交配で三倍体品種‘黄宝’を育成した．‘黄宝’は，樹姿は直立性と開帳性の中間で樹勢が強く，とげは樹齢の若い樹では特に発生が多いので，葉や果実に傷がつく恐れがあるため，新梢の柔らかい時期にとげを取り除く．カンキツかいよう病には，対照の‘川野ナツダイダイ’と比較して強い．現在，県内産地 29 地点で試験栽培が行われており，いずれの地点でも連年よく結実し，着果性に問題は認められておらず，隔年結果性は低い．花粉稔性は，‘農間紅八朔’と比較して低い，約 80% あり，他の三倍体品種と比較すると

高い（Cuenca ら，2010；金好ら，2014；吉田ら，2003）．しかし，発芽率は 1.0% で，他の三倍体品種（金好ら，2014；吉田ら，2003）と同様に著しく低かった．果皮は鮮やかな黄橙色で，アルベドとじょうのうの乖離が容易で，手で剥皮が可能である．花粉の多い品種と同一圃場で栽培しても種子がほぼ入らない．じょうのう膜にはやや苦みがあるが，柔らかいため食べ易く，これまでのブント系品種にはない食べ易い形質を有していた．12 月下旬に完全着色となるが，4 月下旬に糖度が最も高くなり，クエン酸含量は 1.5% を下回るため，成熟期は 4 月下旬以降と考えられた．今後は，冬季の寒波による果皮障害や食味低下に対する対策が必要である．カンキツ類の端境期に成熟期を迎える無核で食べ易い品種であるため，カンキツの需要拡大に貢献できる品種として普及が期待される．

第 4 節 摘要

二倍体‘大橘’を種子親， $2x-4x-4x$ 倍数性キメラ‘不知火’を花粉親とした交配で得られた不完全種子の中の胚を培養して三倍体交雑実生 26 個体を作成し，その中から優良系統を選抜して，新品种‘黄宝’を育成した．‘黄宝’は，樹姿は直立性と開帳性の中間であり，樹勢が強く，枝梢の発生は密で，とげの発生は多い．カンキツかいよう病にやや強く，隔年結果性が低いため栽培し易い品種である．花粉は少なく，花粉の発芽率は極めて低い．果実は球形で短いネックを生じ，果皮は鮮やかな黄橙色で，果実重は約 400g である．手で果皮を剥くことができ，じょうのう膜は柔らかく，ほぼ無核で食べやすい．成熟期は，糖度が最も高くクエン酸含量が 1.5% 以下となる 4 月下旬であり，晩生の新品种として普及が期待される．



第 5-1 図 ‘黄宝’ の系譜

第5-1表 ‘黄宝’の樹体特性

品種名	樹姿	樹勢	枝梢の密度	発芽始期 (月/日)	枝梢の太さ (mm)	枝梢の長さ (cm)	節間長 (cm)	とげ発生率 (%)
黄宝	中間	強	密	4月上旬	6.0 a ^z	20.6 a	1.6 a	76.2 a
農間紅八朔	中間	強	中	4月上旬	4.8 b	22.4 a	1.8 a	0.0 b
川野ナツダイダイ	開張	中	中	4月中旬	4.0 c	20.7 a	1.5 a	5.8 b

品種名	葉身長 (cm)	葉幅長 (cm)	葉形 指数	葉の厚さ (mm)	翼葉の長さ (mm)	翼葉の幅 (mm)	かいよう病 抵抗性	隔年 結果性
黄宝	7.6 b	4.4 b	1.8 b	0.4 a	2.0 a	0.9 a	やや強	低
農間紅八朔	10.3 a	6.2 a	1.7 b	0.3 b	1.6 b	0.8 a	やや強	低
川野ナツダイダイ	9.7 a	4.4 b	2.2 a	0.3 b	1.1 c	0.3 b	やや弱	低

^z同一項目のアルファベットは、Tukeyの多重比較検定により同一符号間で5%水準で有意差がないことを示す(n=10)

第5-2表 ‘黄宝’のステムピッチング発生状況

品 種	調査部位	調査枝数 (本)	発生程度				発生度 ^z
			無	軽	中	甚	
黄宝	2年生枝	29	28	1	0	0	0.7
	3年生枝	9	9	0	0	0	0.0
	4年生枝	3	3	0	0	0	0.0
	計	41	40	1	0	0	0.5
農間紅八朔	2年生枝	48	7	12	16	13	52.1
	3年生枝	34	5	15	6	8	42.9
	4年生枝	7	0	1	2	4	77.1
	計	89	12	28	24	25	50.6

^z発生程度の指数を無, 軽, 中, 甚として次の式により算出

$$\text{発生度} = \frac{[(\text{軽の枝数} \times 1) + (\text{中の枝数} \times 3) + (\text{甚の枝数} \times 5)]}{\text{調査枝数} \times 5} \times 100$$



第 5-2 図 ‘黄宝’ の結実状況



第 5-3 図 ‘黄宝’ の果実

第5-3表 ‘黄宝’の花の特性

品種名	花序の 形成	開花始期	花蕾の重さ (g)	花弁の数	花弁の形	花糸の 分離程度	花粉の 多少	花粉稔性 ^z	花粉発芽率 ^y (%)
黄宝	総状	5月中旬	1.0 ^a	4.4 ^b	短	一部合一	少	78.3 ^b	1.0 ^b
農間紅八朔	総状	5月下旬	1.0 ^a	4.9 ^a	短	一部合一	多	98.9 ^a	35.9 ^a
川野ナツダイダイ	総状	5月中旬	0.6 ^b	5.0 ^a	短	合一	多	92.7 ^{ab}	31.9 ^a

^z各品種3花の花粉について、1花当たり200粒以上の花粉粒を、1%アセトカーミンによる染色で観察

^y各品種とも3花の花粉について、1花当たり200粒以上の花粉粒を、10%シロ糖を加えた1%寒天培地で25℃5時間培養して観察

^x同一項目のアルファベットは、Tukeyの多重比較検定により同一符号間で5%水準で有意差がないことを示す(n=20)

第5-4表 ‘黄宝’の果実特性^z

品種名	着色始期	完全 着色期	成熟期	収量 (kg/m ²)	果実の形	果梗部 の形	果皮の色	果実重 (g)	果皮歩合 (%)
黄宝	10月下旬	12月上旬	4月下旬	3.1	球	短いネック	黄橙	404.2 ^{a^y}	32.2 ^{ab}
農間紅八朔	11月中旬	12月下旬	3月上旬	-	扁球	切平面	濃橙	333.1 ^b	34.4 ^a
川野ナツダイダイ	11月上旬	12月下旬	4月下旬	2.1	扁球	切平面	橙	266.6 ^c	31.3 ^b

品種名	横径 (mm)	縦径 (mm)	果形指数	剥皮性	じょうのう 膜の硬さ	糖度 (°Brix)	クエン酸 含量 (%)	種子数
黄宝	97.5 ^a	87.3 ^a	111.8 ^b	やや易	軟	13.0 ^a	1.44 ^a	0.2 ^c
農間紅八朔	94.5 ^b	72.8 ^b	129.8 ^a	やや難	中	12.9 ^a	1.40 ^a	38.3 ^a
川野ナツダイダイ	90.3 ^c	69.0 ^c	131.1 ^a	やや難	硬	10.6 ^b	1.50 ^a	24.5 ^b

^z果実は2009年3月17日収穫、2009年4月20日調査

^y同一項目のアルファベットは、Tukeyの多重比較検定により同一符号間で5%水準で有意差がないことを示す(n=10)

^x8 mm以上の不完全種子数

第 6 章 総合考察

本研究では、カンキツの三倍体無核性品種の育成に関する研究について、とくに $2x-4x-4x$ 倍数性キメラの利用と倍数性判定の効率化に関する知見を得るための試験を行い、それらの知見を基に新品种の育成を行った。カンキツの無核性品種育成の手法には、ウンシュウミカンに由来する雄性不稔性の利用、放射線照射などの人為的突然変異の誘発、三倍体の利用および無核紀州型無核性の利用などがある。このうち、三倍体は、倍数性を調査することで幼苗期に無核性の個体を選抜できること、育成された三倍体品種は、周辺に植栽される品種の花粉の多少に関わらず無核性が発揮されるなどの利点がある。

三倍体は、主に二倍体と四倍体との正逆交雑から得られる。その育種親となる四倍体は、多胚性品種の珠心胚実生から出現した事例や (Barrett and Hutchison, 1987; Frost, 1925; 河瀬ら, 2005; Longley, 1926; 生山, 1992), 単胚性品種の芽条変異で発見された事例 (吉倉, 2008) があるが、自然界で得られる確率は低い。そのため、三倍体を利用して育種目標に沿った組織的育種を行うためには、多様な遺伝的特性を有する四倍体が育種素材として必要であり、計画的に四倍体を作成していくことが重要である。そこで、第 1 章では、単胚性 13 品種および多胚性 7 品種について、腋芽のコルヒチン処理と芽接ぎの併用法により、四倍体育種素材の作成を行った。その結果、14 品種の四倍体、17 品種の二倍性細胞と四倍性細胞が混在する倍数性キメラを獲得することができた。本研究で倍数体が得られた品種はブンタン類、マンダリン類、タンゴール類およびレモン類など多様であり、本手法がカンキツにおいて幅広い品種に適応可能な染色体倍加法であることを実証した。また、得られた倍数性キメラについて、葉および果実の組織別倍数性と花粉の倍数性を調査し、これを Sugawara ら (2002) の示した茎頂分裂組織起源層の分類に基づき精査した結果、L1 が二倍性、花粉および胚のうの起源層である L2 が四倍性、L3 が四倍性の倍数性周縁キメラ ($2x-4x-4x$ 倍数性キメラ)

であると推定され、四倍体と同様に三倍体育成の交配親として利用できる可能性が示唆された。しかしながら、本手法での倍数体作出率は、本研究では四倍体および倍数性キメラともに 0～6.3%と低率であった。そのため、倍数体の確保のためには多数の腋芽を供試してコルヒチン処理を行う必要があり、今後はさらに効率的な染色体倍加法の開発が必要と考えられた。

コルヒチン処理によって作出した個体群には、染色体が倍加されなかった二倍体や、四倍体および倍数性キメラが混在している。これらから育種親に利用できる倍数体を選抜する基準としては、これまでに、四倍体ではカンキツ属（上曾山ら，2000；生山ら，1992；立川ら，1961）やキンカン属（糠谷，2011）で葉の厚さや花粉粒の大きさが報告されており、 $2x-4x-4x$ 倍数性キメラではキンカン属（糠谷，2011；安田ら，）で同様の報告がある。第 2 章では、カンキツ属の四倍体 11 品種、 $2x-4x-4x$ 倍数性キメラ 12 品種について形態的特性の調査を行い、二倍体と比較して、四倍体および $2x-4x-4x$ 倍数性キメラは葉が厚く花粉粒径が大きいこと、四倍体は葉の気孔密度が低いことを明らかにした。これらの形質は、具体的な数値による指標として、コルヒチン処理個体群から四倍体および $2x-4x-4x$ 倍数性キメラ候補を粗選抜するために利用でき、これにより、フローサイトメトリーなどの倍数性調査の効率化が可能と考えられた。

本研究におけるコルヒチン処理においては、四倍体は得られず $2x-4x-4x$ 倍数性キメラのみが得られた品種が 30%あった。そこで第 3 章では、 $2x-4x-4x$ 倍数性キメラの、三倍体育成の交配親としての有効性を明らかにするために、単胚性の $2x-4x-4x$ 倍数性キメラを種子親として二倍体を交配した。この交配により得られた完全種子は、四倍体を種子親とした交配と同様にすべて三倍体であった。また、 $2x-4x-4x$ 倍数性キメラを花粉親として二倍体に交配すると、四倍体を花粉親とした交配と同様に、得られた完全種子は二倍体あるいは四倍体で、不完全種子はすべて三倍体であった。これらのことから、 $2x-4x-4x$ 倍数性キメラは、四倍体と同様に、三倍体の作出に利用で

きることが明らかになった．これらのコルヒチン処理で作出された同質四倍体は，雑種四倍体の交配親としても活用でき，四倍体育種素材の遺伝的多様性を広げる素材として有用である．また $2x-4x-4x$ 倍数性キメラは，茎頂分裂組織からの葉，枝，花および果実などの各組織の分化について，詳細な解明を行う研究材料としても有用であると考えられる．

三倍体の作出を目的とした交雑では，三倍体以外にも二倍体，四倍体（金好ら，1997；立川ら，1961；八幡ら，2003），五倍体（Alezaら，2012；金好ら，2008）および六倍体（Esen・Soost，1972，1973；生山，1992）が出現する事例がある．これまで，実生の倍数性は，発芽直後における根端細胞の染色体数調査（生山，1981）や，フローサイトメトリーによる実生葉などの倍数性解析で判定していた．品種育成では，膨大な交雑実生から選抜を行う必要があり，目的とする倍数体を早期に簡易に選抜することは，育種の効率化において重要である．第4章では，完熟種子において，胚以外の種子組織の倍数性を調査することで，胚の倍数性を推定する方法を見出した．種子組織の発育過程の観察と組織別の倍数性調査により，胚の発達とともに消滅すると考えられていた胚乳が，カラザ部を除いた胚と内種皮の間に膜状となって残存し，成熟期には内種皮と一体化した組織を形成することが明らかとなり，これを ISE（Inner Seed coat with Endosperm）種皮と仮称した．この ISE 種皮の倍数性は，成熟した種子でも測定でき，胚乳の倍数性と一致した．これは，内種皮の倍数性が種子の成熟とともに検出されなくなり，胚乳の倍数性のみが検出されるためである．この ISE 種皮の倍数性から，胚の倍数性，さらには胚を形成した配偶子の倍数性を推定でき，胚を傷つけることなく，播種時に必要な倍数体を選抜できることが明らかとなった．この知見は，無胚乳種子を形成するカンキツにおいて，成熟種子の内種皮の内側に胚乳組織が残存していることを初めて明らかにしたもので，これまでにゴマでも同様な現象が報告されている（小林，1986；鈴木，2003）．胚乳の膜状化および残存は，他の無胚乳種

子とされる植物でも生じている可能性があり，交雑種子での早期の倍数性推定技術として，今後の研究が期待される．

以上のような研究を進める中で，作出した倍数体を利用して，第5章では新品種を育成した．二倍体‘大橘’を種子親とし， $2x-4x-4x$ 倍数性キメラ‘不知火’を花粉親とした交雑集団より，果実品質の優れた三倍体系統を選抜した．これを‘黄宝’と命名して品種登録を行い，その特性を明らかにした．ブントアン由来の品種では，種子が多く剥皮しにくい品種が多い中で，本品種は無核性で連年結果し，既存のブントアン類よりも剥皮し易く食べ易い品種である．成熟期はカンキツが端境期となる4月下旬以降であり，晩生品種として普及が期待される．

本研究は，カンキツのコルヒチン処理により作出した四倍体および $2x-4x-4x$ 倍数性キメラ個体の組織別倍数性および形態的特性による選抜方法と，種子のISE種皮による交雑実生およびその配偶子の倍数性判定法を明らかにし，カンキツの倍数性育種を効率化する技術を開発した．また， $2x-4x-4x$ 倍数性キメラが，四倍体と同様に三倍体育成の交配親として利用できることを明らかにして，それを利用した新品種を開発し，三倍体を利用した無核性品種の育成に大きく寄与している．

第 7 章 総摘要

カンキツ類において，三倍体を利用した無核性品種育成は，主に四倍体と二倍体の交雑により行われており，四倍体は重要な育種素材である．このため，カンキツ類では，コルヒチン処理などによる人為的な四倍体作出が行われている．本研究では，コルヒチン処理によって四倍体とともに作出された倍数性キメラが，葉組織，果実組織および花粉の倍数性から，花粉および胚のうの起源層となる L2 が四倍性で，四倍体と同様に三倍体育成の交配親として活用できる $2x-4x-4x$ 倍数性キメラであることを明らかにした．

本研究で供試した品種では，四倍体および $2x-4x-4x$ 倍数性キメラは，二倍体と比較して葉が厚く，花粉粒径が大きかった．また，四倍体は二倍体と比較して気孔密度が低いが， $2x-4x-4x$ 倍数性キメラでは有意差は認められなかった．これらの形質を利用して，コルヒチン個体群から四倍体および $2x-4x-4x$ 倍数性キメラを粗選抜し，フローサイトメトリーによる倍数性調査を効率化できることが示唆された．

単胚性の $2x-4x-4x$ 倍数性キメラを種子親とした二倍体との交雑では，得られた完全種子および不完全種子はすべて三倍体であった．また， $2x-4x-4x$ 倍数性キメラを花粉親とした二倍体との交雑では，得られた不完全種子がすべて三倍体であった．このように， $2x-4x-4x$ 倍数性キメラを交配親とした交雑では，四倍体を交配親とした場合と同様の種子形成および交雑実生の倍数体が得られ，四倍体と同様に三倍体育成の交配親として利用できることが明らかとなった．

カンキツの交雑で得られた成熟果実中の完全種子において，組織別に倍数性を調査した結果，内種皮の倍数性と胚乳の倍数性が一致した．種子組織の発育過程の観察により，胚の発育とともに消滅すると考えられていた胚乳は，膜状化してカラザ部を除いた内種皮内側に存在していることが明らかとなった．種子の成熟とともに，膜状となった胚乳は内種皮と一体化した組織（ISE（Inner Seed coat with Endosperm）種皮）を形成し，内種皮の倍数性は検出されなく

なり，一方で，胚乳の倍数性のみが検出された．そのため，成熟種子の内種皮とされていた組織の倍数性は胚乳の倍数性と一致した．この ISE 種皮の倍数性から，胚およびその配偶子の倍数性を推定でき，胚を傷つけることなく播種時に必要な倍数体を選抜できることが明らかとなった．

二倍体‘大橘’を種子親， $2x-4x-4x$ 倍数性キメラ‘不知火’を花粉親とした交配で得られた不完全種子を培養し，三倍体新品種‘黄宝’を育成した．‘黄宝’は，樹勢が強く，とげの発生は 76.2% と多いが，隔年結果しにくく，カンキツかいよう病に強い．果実は球形で短いネックが入り，果皮は鮮やかな黄橙色で，果実重は約 400 g である．果皮やじょうのう膜は柔らかく，ほぼ無核で，食べやすい．成熟期は 4 月下旬以降で，晩生の新品種として普及が期待される．

引用文献

- Aleza, P., J. Juarez, M. Hernandez, P. Ollitrault and L. Navarro. 2009. Production of tetraploid plants of non-apomictic citrus genotypes. *Plant Cell Rep.* 28 : 1837-1846.
- Aleza, P., J. Juarez, M. Hernandez, P. Ollitrault and L. Navarro. 2012. Implementation of extensive citrus triploid breeding programs based on $4x \times 2x$ sexual hybridisations. *Tree Genet. Genomes* 8 : 1293-1306.
- Barrett, H. C. and D. J. Hutchison. 1987. Spontaneous tetraploidy in apomictic seedlings of citrus. *Econo. Bot.* 32 : 27-45.
- Cameron, J. W. and H. B. Frost. 1968. Genetics, breeding, and nucellar embryony. p. 325-370. In: Reuther, W., L. D. Batchelor and H. J. Webber (eds.). *The citrus industry vol II*. University of California, Division of Agricultural Sciences, California.
- Cuenca, J., P. Aleza, J. Juarez, J. A. Pina and L. Navarro. 2010. 'Safor' mandarin : a new citrus mid-late triploid hybrid. *HortScience* 45 : 977-980.
- 愛媛県立果樹試験場. 1994. 種苗特性分類調査報告書(カンキツ類). p. 4.
- Esen, A. and R. K. Soost. 1971. Unexpected triploids in citrus : their origin, identification, and possible use. *J. Hered.* 62 : 329-333.
- Esen, A. and R. K. Soost. 1972. Tetraploid progenies from $2x \times 4x$ crosses of citrus and their origin. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 97 : 410-414.
- Esen, A. and R. K. Soost. 1973. Seed development in citrus with special reference to $2x \times 4x$ crosses. *J. Amer. Bot.* 60 : 448-462.
- Esen, A., R. K. Soost and G. Graci. 1978. Seed set, size and development after $4x \times 2x$ cross in citrus. *Euphytica* 27 : 283-294.
- Frost, H. B. 1925. Tetraploidy in citrus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 11 : 535-537.

- Frost, H. B. and R. K. Soost. 1968. Seed reproduction: Development of gametes and embryos. p. 290-324. In: Reuther, W., L. D. Batchelor and H. J. Webber, (eds.). The citrus industry vol II. University of California, Division of Agricultural Sciences, California.
- 古田貴音・金好純子・金谷新作. 2004. カンキツのコルヒチン処理個体における倍数性の変化と四倍体選抜. 園学雑. 73 (別 2): 102
- 原 襄. 1994. 植物形態学. 朝倉書店. 東京.
- 春崎聖一・國料大輔・國武久登・小松春喜. 2000. フローサイトメトリーによるカンキツ類の倍数性の判定. 九州東海大農紀要. 19: 45-52.
- 岩政正男. 1999. 遺伝と育種. p. 288-312. 岩堀修一・門屋一臣編. カンキツ総論. 養賢堂. 東京.
- 岩波洋造. 1980. 花粉学. p. 5-18. 講談社. 東京.
- 上曾山 茂・佐保 学・國武久登. 2000. コルヒチン処理によるカボス 4 倍体の作出. 九州農業研究. 62. 227.
- 金好純子・古田貴音・蔵尾公紀・山口 聡. 2008. 単胚性カンキツにおけるコルヒチン処理による四倍体の作出とその種子親としての利用による三倍体の獲得. 園学研. 7: 5-10.
- 金好純子・古田貴音・塩田 俊・赤阪信二・柳本裕子・栗久宏昭. 2014. レモン自然交雑実生における三倍体の出現と新品種‘イエローベル’の育成. 園学研. 13: 19-26.
- 金好純子・加納徹治・桑田祐二・平尾 晃・中谷宗一・小林省蔵. 1997. カンキツ類の三倍体品種の育成 (第 1 報) ウンシュウミカンと四倍体ボンカンの交雑による雑種三倍体の作出. 園学雑. 66: 9-14.
- 金好純子・山口 聡. 2002. コルヒチン処理により得られたカンキツキメラ個体の倍数性構造と交配親としての活用. 園学雑. 71 (別 2): 229.

- 河瀬憲次・八幡昌紀・中川匠子・原口加奈・國武久登．2005．ニンポウキンカンにおける同質四倍体の選抜とその特性．園学研．4：141-146．
- 小林貞作．1986．ゴマの来た道．岩波書店．東京．
- Longley, A. E. 1926. Triploid Citrus. Washington Acad. Sci. 16：543-545.
- 中野道治・清水徳朗・須川 瞬・金好純子・喜多正幸・吉岡照高・北島 宣．2012．核 SSR 及び葉緑体 DNA 配列によるレモンおよび香酸カンキツ類の多様性解析．園学研 11．（別 2）：312．
- 中島光廣・徳永忠士・新居美香・津村哲宏・山本浩史・坂口 優・山尾正実．2015．三倍体香酸カンキツ新品種‘阿波すず香’の育成．徳島農林水総技支援セ研報．2．9-12．
- 糠谷綱希・太田知宏・安田喜一・八幡昌紀・國武久登・小松春喜・新居直祐・向井啓雄・原田 久・高木俊彦．2011．ニンポウキンカン珠心胚へのコルヒチン処理によって得た倍数体の特性とそれらの三倍体育種への利用．園学研．10：1-8．
- 生山 巖．1981．カンキツ類の根端細胞における染色体の一観察法について．果樹試報．D3：1-7．
- 生山 巖．1992．カンキツ類の倍数性育種に関する研究－主として四倍体育種素材の作出について－．果樹試報特．3：1-68．
- Oiyama, I. and S. Kobayashi. 1993. Haploids obtained from diploid $\times$ triploid crosses of Citrus. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 62：89-93.
- Oiyama, I., S. Kobayashi, Y. Yoshinaga, T. Ohgawara and S. Ishii. 1991. Use of pollen from a somatic hybrid between citrus and poncirus in the production of triploid. HortScience 26：1082.
- 生山 巖・奥代直巳．1983．カンキツ類の倍数性育種に関する研究．Ⅲ． $2x$ スウィートオレンジ $\times 2x$ の組合せにおける 3 倍体の出現について．果樹試報．D5：1-8．
- Recupero, G. R., G. Russo and S. Recupero. 2005. New

- promising *Citrus* triploid hybrids selected from crosses between monoembryonic diploid female and tetraploid male parents. HortScience 40 : 516-520.
- Recupero, G. R., G. Russo and S. Recupero. 2007. 'Yellow Star Seedless'. US20050166293 P1.
- Recupero, G. R., G. Russo and S. Recupero. 2008. 'Top Mandarin Seedless'. US20060179524 P1.
- Soost, R. K. and J. W. Cameron. 1980. 'Oroblanco' a triploid pommelo-grapefruit hybrid. HortScience 15 : 667-669.
- Soost, R. K. and J. W. Cameron. 1985. 'Melogold' a triploid pommelo-grapefruit hybrid. HortScience 20 : 1134-1135.
- Starrantino, A. and G. R. Recupero. 1981. Citrus hybrids obtained *in vitro* from 2x females $\times$ 4x males. Proc. Int. Soc. Citricult. 31-32.
- Sugawara, K., T. Wakizuka and A. Oowada. 2002. Histogenic identification by RAPD analysis of leaves and fruit of newly synthesized chimeric citrus. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 127: 104-107.
- 鈴木善弘. 2003. 種子生物学. P. 11-18. 東北大学出版会. 仙台.
- 高村武二郎・吉村奈津紀. 2007. フローサイトメトリーを用いたシクラメン植物体および花粉の倍数性検定. 香川大農学報. 59 : 49-53.
- 立川忠夫・田中諭一郎・原 節生. 1961. 柑橘の品種改良に関する研究 (I) 3 倍体柑橘の育成. 静岡県柑橘試験場業績. 第 83 号.
- 徳永忠士・新居美香・津村哲宏・山尾正実. 2005. スダチにおける四倍体と二倍体との交雑による三倍体雑種の作出および無核品種 '徳島 3X1 号' の育成. 園学研. 4 : 11-15.
- Toolapong, P., H. Komatsu and M. Iwamasa. 1996. Triploids and haploid progenies derived from small seeds of 'Banpeiyu', a pummelo, crossed with 'Ruby Red' grapefruit. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 65 : 255-260.

- van Tuyl, J. M., J. N. de Vries, R. J. Bino and T. A. M. Kwakkenbos.
1989. Identification of 2n-pollen producing interspecific hybrids
of *Lilium* using flow cytometry. *Cytologia* 54 : 737-745.
- 八幡昌紀・柏原有希子・黒木宏憲・國武久登・小松春喜. 2004. ニンポウキンカン種子へのコルヒチンおよびオリザリン処理が四倍体植物誘導に及ぼす影響. 園学研. 3 : 11-16.
- 八幡昌紀・岡 信孝・國武久登・山口清二・小松春喜. 2003. ‘晩白柚’と四倍体の正逆交雑から得られた種子の重さと倍数性との関係. 園学研. 2 : 247-252.
- Yamada, A. and R. Tao. 2007. Controlled pollination with sorted reduced and unreduced pollen grains reveals unreduced embryo sac formation *Diospyros kaki* Thunb. ‘Fujiwaragosho’. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 76 : 133-138.
- 山榮午朗・金子和彦・松本 理. 1996. ブンタンの小粒種子利用による3倍体の作出と生育促進. 山口農試研報. 47 : 26-31.
- 柳本裕子・金好純子. 2017. レモン自然交雑で生じた小粒種子の利用による三倍体の育成. 園学研. 16 (別 2) : 109.
- 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’の倍数性キメラの証明とその形態的特性. 園学研. 7 : 165-171.
- 吉田俊雄・根角博久・吉岡照高・家城洋之・伊藤祐司・中野睦子・上野 勇・山田彬雄・村瀬昭治・瀧下文孝. 2003. キンカン新品種 ‘ぷちまる’. 果樹研報. 2 : 9-16.
- 吉倉幸博. 2008. ヒュウガナツの多目的ネット栽培法. 宮崎県総農試報. 43 : 8-26.
- 楊 曉伶・北島 宣・長谷川耕二郎. 2002. ‘土佐文旦’×‘水晶文旦’の倍数性交雑実生の染色体構成に基づく対合染色体と非還元配偶子の推定. 園学雑. 71 : 538-543.

謝 辞

本研究の遂行および本論文の執筆にあたり，終始御懇切なる御指導，御校閲を賜った京都大学大学院農学研究科教授 北島 宣博士に謹んで感謝の意を表します．また，御校閲を賜り，貴重な御助言をいただいた京都大学大学院農学研究科教授 奥本 裕博士および同大学大学院農学研究科教授 田尾龍太郎博士に心から感謝の意を表します．

本研究の実施およびとりまとめの全期間を通し，終始多大な御指導と御鞭撻および暖かい御激励をいただいた広島県立農業技術センター果樹研究部総括研究員金好純子博士に心から感謝の意を表します．研究の実施にご助力，御助言をいただいた広島県立農業技術センター栽培技術研究部主任研究員古田貴音氏に深く感謝申し上げます．研究のとりまとめに御助言をいただいた国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹茶業研究部門ブドウ・カキ研究領域主任研究員山崎安津博士に深く感謝申し上げます．研究の遂行にあたり，ご協力，御助言をいただいた，広島県立総合技術研究所農業技術センター果樹研究部主任研究員塩田 俊氏，部長赤阪信二氏，総括研究員川崎陽一郎氏，元次長長久 逸氏，同センター次長平尾 晃氏，同センター長新田浩通氏に厚く御礼申し上げます．また，実験処理，調査および供試樹管理などの作業において御尽力いただいた広島県立総合技術研究所農業技術センター嘱託員各位に深く感謝申し上げます．