

キンカン属植物への細胞工学的手法による  
カンキツゲノムの部分的な導入に関する研究

(課題番号 14560025)

平成14年度～平成16年度科学研究費補助金(基盤研究(C))

研究 成 果 報 告 書

平成17年3月

研究代表者 國武 久登

(宮崎大学農学部)

## はじめに

本報告書は、平成 14 年度から 16 年度までの 3 年間にわたる文部科学省科学研究費基盤研究 C (2) による研究成果の概要をとりまとめたものである。

カンキツ類の細胞融合による体細胞雑種が育成されて 20 年近くが経とうとしている。最初の成功例は、ポリエチレングリコール(PEG)法により‘トロビタ’スイートオレンジの珠心カルス由来プロトプラストとカラタチの葉肉プロトプラストを融合したものである (Ohgawara et al., 1985)。この体細胞雑種‘オレタチ’は、細胞融合をはじめとする植物バイオテクノロジー分野の発展に大きく寄与したが、果皮が厚く、その表面は荒く、果汁が少なく、好ましくない香りがあるなど果実形質が不良で、育種母本としても利用が困難なものであった (Kobayashi et al., 1991)。その後、同様な手法で育成された‘シュウブル’、‘マープル’、‘グレーブル’および‘ユーブル’も厚い果皮を有し、有望な品種には成り得なかった (Kobayashi et al., 1995)。世界的にもカンキツ類の体細胞雑種の育成は 250 例以上を越えているが、現在までに有望な品種になったという報告はない。最終的には、この細胞融合技術の欠点を解決することができず、一部の有用遺伝子のみを導入できる遺伝子組換え技術へと育種研究の主流が変わっていった。しかしながら、形質転換体の安全性が懸念され、食用作物への形質転換について消費者からの理解が得られず、米国以外の先進国ではなかなか生産、消費が伸び悩んでいる状況である。

最近、細胞工学的手法に改良が加えられ、対称融合から非対称融合へと発展し、半数性ゲノムまたは部分的な染色体導入が実験植物で成功し始めている。また、花粉母細胞等に有糸分裂阻害剤を処理することにより、染色体を数本有するマイクロプロトプラストが単離されている。このような新しい技術は、細胞融合の問題点を解消するものであり、育種上極めて有効であると思われる。

そこで、本研究では、細胞工学的手法を用いて、キンカン属植物へカンキツゲノムを部分的に導入していくために、非還元雌雄性配偶子が関与した非対称異質ゲノム雑種の育成、カンキツ半数体植物の形態的および遺伝学的特性とその部分ゲノム導入への利用、およびマイクロプロトプラストによる部分ゲノム導入について検討した。科学研究費補助金交付期間内に、カンキツ類において、マイクロプロトプラストの単離および細胞融合による非対称融合雑種は育成できなかったが、非還元配偶子を利用した倍数体の育成、ブンタン半数体の特性や後代への遺伝性、ブンタン半数体の稔性配偶子の発生原因の推測、細胞融合による体細胞雑種の育成、培養カルスを用いた細胞融合による予期しない倍数体の発生原因の推測は、今後キンカンを含めたカンキツ類の育種を進めるにあたり、有用な情報を提供するものであり、カンキツ類の細胞工学的育種法に関する技術的な基盤を築いたものと考えている。

平成 17 年 3 月

研究代表者  
宮崎大学農学部  
國武 久登

## 研究組織

研究代表者	宮崎大学農学部応用生物科学科	國武 久登
研究分担者	宮崎大学農学部応用生物科学科	藪谷 勤
研究協力者	九州東海大学農学部応用植物科学科	小松 春喜
	鹿児島大学大学院連合農学研究科	八幡 昌紀
	九州東海大学農学部	松丸 安曇
	(現 株式会社 ミヨシ 八ヶ岳営業育苗センター)	
	宮崎大学農学研究科	黒木 宏憲
	(現 宮崎県庁営農支援課)	
	宮崎大学農学研究科	高見 佳代
	(現 株式会社 ジャパンシーフーズ)	

## 研究経費

平成14年度	1,500	千円
平成15年度	1,100	千円
平成16年度	1,100	千円
計	3,700	千円

## 研究発表

学術誌等

- 1) Takami, K., A. Matsumaru, M. Yahata, H. Kunitake and H. Komatsu: Utilization of intergeneric somatic hybrids as an index discriminating taxa in the genus Citrus and its related species. *Sexual Plant Reproduction (in press)*
- 2) 河瀬 憲次、八幡 昌紀、中川 匠子、原口 加奈、國武 久登 : 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、園芸学研究 (印刷中)
- 3) Yahata, M., H. Kurogi, H. Kunitake, K. Nagano, T. Yabuya, K. Yamashita and H. Komatsu: Evaluation of reproductive function in a haploid pummelo by crossing with several diploid citrus cultivars. *J Japan Soc Hort Sci (in press)*
- 4) Yahata, M., S. Harusaki, K. Takami, P. Toolapong, H. Kunitake, K. Yamashita and H. Komatsu: Production of fertile haploid Banpeiyu pummelo (*Citrus grandis* Osbeck) and its morphological characteristics. *J. Amer. Soc Hort Sci.*, Vol. 130, No. 1, 34-40 (2005)
- 5) Takami, K., A. Matsumaru, M. Yahata, H. Kunitake and H. Komatsu: Production of intergeneric somatic hybrids between round kumquat (*Fortunella japonica* Swingle)

- and Morita navel orange (*Citrus sinensis* Osb.). *Plant Cell Reports*, 23:39-45 (2004)
- 6) 八幡昌紀、柏原夕希子、國武久登、小松春喜：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. 園芸学研究、3巻、1号、11-16 (2004)
  - 7) 八幡昌紀、岡信孝、國武久登、小松春喜：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. 園芸学研究、2巻、4号、247-252 (2003)
  - 8) Kunitake, H., A. Matsumaru, K. Takami, H. Komatsu: Molecular and cytogenetic characterization of triploid somatic hybrids between Shougun mandarin and Grapefruit, *Plant Biotechnology*, Vol. 19, No. 5, 345-352 (2002)

#### 学会発表

- 1) 八幡昌紀・黒木宏憲・國武久登・長野克也・藪谷 勤・山下研介・小松春喜：半数体‘晩白柚’と二倍体品種との正逆交雑から得られた実生の遺伝解析. 園芸学会平成 16 年度春季大会, 第 73 巻別冊 1, P54, 2004 年.
- 2) 八幡昌紀・柏原夕希子・國武久登・小松春喜：新梢へのコルヒチン処理による‘晩白柚’の倍加二倍体の育成. 園芸学会平成 15 年度秋季大会, 第 72 巻別冊 2, P274, 2003 年.
- 3) 八幡昌紀・関本貴則・國武久登・小松春喜：‘晩白柚’と体細胞雑種との交雑による三倍体の育成. 園芸学会九州支部研究集録, 第 11 号, P21, 2003 年.
- 4) 高見佳代・松丸安曇・斎竹久美子・八幡昌紀・國武久登・小松春喜：カンキツ野生種シトロプシスと‘ショウゲン’マンダリンとの電気細胞融合による属間体細胞雑種の育成. 園芸学会平成 15 年度春季大会, 第 72 巻別冊 1, P378, 2003 年.
- 5) 八幡昌紀・鈴木淳矢・國武久登・小松春喜：半数体‘晩白柚’の形態的特徴とその生殖機能. 園芸学会平成 14 年度秋季大会, 第 71 巻別冊 2, P315, 2002 年.
- 6) 松丸安曇・高見佳代・國武久登・小松春喜：‘森田ネーブル’とマルキンカンの電気細胞融合による属間体細胞雑種の育成. 園芸学会平成 14 年度秋季大会, 第 71 巻別冊 2, P520, 2002 年.
- 7) 國武久登・黒木宏憲・柏原夕希子・八幡昌紀・小松春喜：ニンポウキンカンの四倍体育成に及ぼす種子へのコルヒチンとオリザリン処理の影響. 園芸学会九州支部研究集録, 第 10 号, P8, 2002 年.
- 8) 八幡昌紀・國武久登・小松春喜：カンキツの二倍体と四倍体の正逆交雑から得られた種子の重さと実生の倍数性との関係. 園芸学会平成 13 年度秋季大会, 第 70 巻別冊 2, P409, 2001 年.

## 目 次

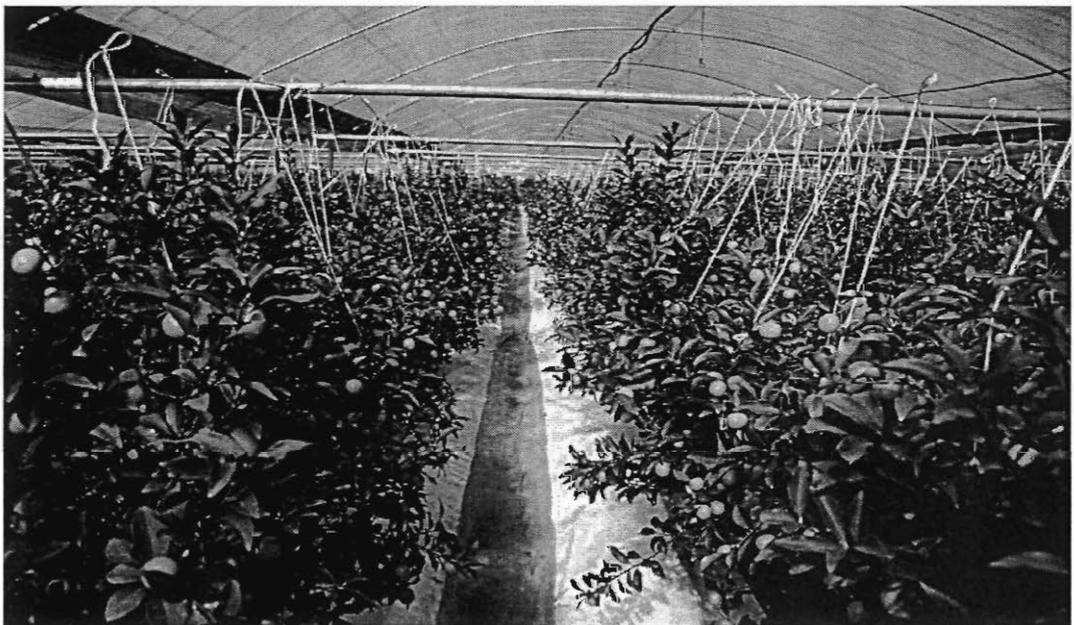
緒言	1
I. 非還元雌雄性配偶子が関与した非対称異質ゲノム雑種の育成	4
1) キンカン属植物の種間交雑	
2) カンキツ品種‘清見’および‘南風’とキンカン属との属間交雑における予期しない倍数体の発生	
3) ニンポウキンカンの有糸分裂阻害剤処理による四倍体の育成	
4) 二倍体と四倍体との種間交雑における予期しない倍数体の発生	
II. カンキツ半数体植物の形態的および遺伝学的特性とその部分ゲノム導入への利用	10
II-1. 半数体の特徴とその後代実生の倍数性評価	10
1) ‘晩白柚’半数体の形態的特徴	
2) カンキツ単胚性品種と‘晩白柚’半数体との交雑	
3) キンカン単胚性品種と‘晩白柚’半数体との交雑	
4) 非還元雌雄性配偶子の発生要因の解明	
II-2. 細胞融合による部分ゲノムの導入	17
1) カンキツとシトロプシスとの電気細胞融合	
2) ‘晩白柚’半数体とニンポウキンカンとの電気細胞融合	
3) ネーブルオレンジとキンカンとの電気細胞融合	
4) カンキツとグレープフルーツとの電気細胞融合	
III. マイクロプロトプラストによる部分ゲノム導入	20
1) ニンポウキンカンからの花粉プロトプラストの単離	
2) ニンポウキンカンの花粉プロトプラストとカンキツ二倍体との電気細胞融合	
総合考察	21
公表論文再録	22

## I. 緒言

一般にカンキツ類とは、ミカン科、ミカン亜科のカンキツ属、キンカン属、カラタチ属の3属を指し、世界の重要な果樹の一つとして亜熱帯から温帯に至る広い地域で栽培されている。

近年、我が国の果樹産業は、オレンジの輸入自由化などによる輸入果実の増大、国内での消費の減少、生産者の高齢化や担い手不足など、厳しい状況にある。特にカンキツにおいては、ウンシュウミカンの過剰生産とも相俟って、極めて困難な環境にあるため、市場の拡大を目的とした優良品種の育成が強く望まれている。

キンカンは、カンキツ類の中では果皮を食す唯一の素材であり、果皮の皮を剥くことを嫌がる現代人には有望な果樹の1つである。米国では古くから属間交配による育種が行われ、ライムカット (*C. aurantifolia* 'Mexican' × *F. margarita*)、オレンジカット [*C. reticulata* × (*F. japonica* × *F. margarita* 'Meiwa')], シトルムカット [*Poncirus. trifoliata* × *F. japonica* or *F. margarita*], シトカット [*P. trifoliata* × (*P. trifoliata* × *F. japonica*) 'Citrumquats'] などが育成されたが、これらはキンカンの耐病性を利用した台木としての育種であり、食用としての育種ではナガキンカンとウイリツツシトレンジとの交雑から 'トーマスビルシトレンジカット' と 'テルフェアシトレンジカット' が育成され、前者がわずかであるが品種として一部食用に利用されたのみで (岩政, 1976)、現在、食用キンカンの栽培品種となっているのはニンポウキンカン (*Fortunella. crassifolia* Swingle) のみである。



キンポウキンカンの施設栽培 (収穫時期、1月下旬、宮崎県)

キンカン属 (*Fortunella*) は、植物分類学上ミカン科 (Rutaceae), ミカン亜科 (Aurantioideae) に属し、亜熱帯から温帯に至る広い地域で栽培されており、原産地は中華人民共和国の南部地域と考えられている。カンキツ属 (*Citrus*) と異なる点は、葉に網脈がなく、有脂かつ果面が滑らかで、室数が少なく、1室内に並生する胚珠が2つ以下で少ないこと、常緑の低木であることや枝が細く密集することなどがあげられる。我が国の露地栽培では、カンキツ属が5月初旬に開花するのに対し、キンカン属は7月の開花が多い。また、果実は小さく、10g内外であり、果皮はやや厚く橙黄色から濃橙色を呈し、果肉は淡黄色で、果汁は少なく酸が高い特徴を有している。種子は、1果当たり4~5粒程度で、一般に小さく滑らかで、胚は濃緑色を呈している (廣瀬, 1988) これまでに、ナガキンカン [*F. margarita* (Lour.) Swingle], ニンポウキンカン (*F. crassifolia* Swingle), マルキンカン (*F. japonica* (Thunb.) Swingle), ナガバキンカン [*F. polyandra* (Ridl.) Tanaka], フクシュウキンカン (*F. obovata* Tanaka) 及びマメキンカン [*F. hindsii* (Champ.) Swingle] の6種が知られており、果実は生食のほか糖果やマーマレードなどの加工品として利用され、フクシュウキンカンやマメキンカンは鑑賞樹として利用されている。

我が国のキンカンの栽培は宮崎県や鹿児島県など、主に南九州地域であり、近年施設栽培による完熟果の生産が定着し、果実品質が向上したことから生果としての需要が増大しつつある。前述したとおり、経済栽培品種がニンポウキンカンのみであり、最近、二倍体ナガミキンカンと四倍体ニンポウキンカンとの三倍体品種雑種‘おちまる’が品種登録されたが (吉田ら, 2000), カンキツ属と比べると、ほとんど品種改良が行われていないのが現状である。

近年、組織培養や細胞融合等の細胞工学的技術が急速に進歩し、カンキツにおいても多くの体細胞雑種が報告されている。カンキツの育種は多胚性、珠心胚形成や雌雄性不稔のために交雑育種が困難な場合があるが、細胞融合技術を利用することで、これらの障壁に関係なく雑種を作ることができる。カンキツの組織培養は、Rangaswamy (1959) が多胚性品種の胚珠培養により興味ある結果を報告してから、珠心や珠心培養が集中して行われるようになり、急速に発展した。Kochba *et al.* (1972) は、‘シャムーティオレンジ’の未受精の胚珠を培養し、胚分化能 (embryogenic) をもつカルスをはじめて誘導し、その後、多くの品種で珠心カルスが誘導された。カンキツのバイオテクノロジーはこの珠心胚に由来するカルスのお陰で大きく進んだといっても過言ではない。また、細胞融合により体細胞雑種を得るためにはプロトプラストからの植物体再生システムの開発が不可欠である。カンキツのプロトプラストは、最初に‘シャムーティ’オレンジの珠心カルスを用いて作成された (Vardi *et al.*, 1975)。以後、多くの品種で珠心カルスからプロトプラストが作られ、培養されて胚となり、植物体にいたっている (Vardi *et al.*, 1982; Kobayashi *et al.*, 1983; Ling *et al.*, 1990)。これらのプロトプラスト系を利用して作られたカンキツの最初の体細胞雑種が‘オレタチ’である (Ohgawara *et al.*, 1985)。これは、トロピタオレンジの胚分化能を持つカルス由来プロトプラストと胚分化能を持たないカラタチの葉のプロトプラストをポリエチレングリコール法 (PEG) で融合したものである。この‘オレタチ’はカンキツの細胞融合の分野の発展に大きく寄与したが、果皮が厚く、その表面は荒く、果汁が少なく、好ましくない香りがあるなど果実形質が不良で、育種母本としても利用が困難なものであった (Kobayashi *et al.*, 1991a)。その後、ネーブルと‘マーコット’の体細胞雑種‘マーブル’ (Kobayashi *et al.*, 1988a)、ネーブルとウンシュウミカンの‘シュ

ウブル' (Kobayashi *et al.*, 1988b), ネーブルとグレープフルーツの 'グレーブル' (Ohgawara *et al.*, 1989) などの体細胞雑種が報告され, その後も多くの体細胞雑種が報告された. このように, カンキツ属における体細胞雑種は数多く報告されているにもかかわらず, キンカン属での体細胞雑種は, スイートオレンジ+ニンポウキンカン (Deng *et al.*, 1992), マメキンカン+カラタチ (Miranda *et al.*, 1997), バレンシアオレンジ+ニンポウキンカン (Cheng *et al.*, 2002) の 3 例しか報告されておらず, カンキツと比較すると極めて少ない.

近年, 配偶子の形成, 受粉, 花粉管伸長, 重複受精および自家不和合性等の植物の生殖行動が明らかにされつつある. それには, 非常に低い割合ではあるが, 基本を逸脱した行動をするものがある. それらの現象を明らかにし, 遺伝育種学的に利用することは育種効率を向上させることに繋がる. また, 雌雄性生殖細胞を非対称細胞融合により, 部分的なゲノムの導入に応用することは, 単に倍数体を育成するばかりでなく, 生殖細胞と体細胞との機能的または生理的な違いを明らかにできる可能性がある. さらに, 配偶子の細胞質オルガネラの状態を理解する上でも興味のあることである.

以上の知見をもとに, 下記の 3 つのテーマについて研究を行った.

#### I. 非還元雌雄性配偶子を利用した部分ゲノムの導入

#### II. カンキツ半数体植物の形態的および遺伝学的特性とその部分ゲノム導入への利用

##### II-1. 半数体の特徴とその後代実生の倍数性評価

##### II-2. 細胞融合による部分ゲノムの導入

#### III. マイクロプロトプラストによる部分ゲノムの導入

## I. 非還元雌雄性配偶子を利用した部分ゲノムの導入

カンキツでは、二倍体間交雑で得られる充実した小粒種子は高い頻度で三倍体となり、その発生には非還元配偶子の関与が明らかにされている。最近、限定された品種間ではあるが、花粉にも非還元配偶子の発生が報告されている。しかしながら、カンキツとキンカンの属間交雑において、非還元配偶子関与による三倍体の発生は報告されていない。そこで、キンカンの種間交雑およびカンキツとキンカンの属間交雑を行い、後代の予期されない倍数性の発生について検討し、非対称でのゲノム統合の有無について明らかにした。

### 1. キンカン属植物の種間交雑

キンカン属内の種間交雑について検討するため、種子親、花粉親ともに鹿児島県出水郡東町日本マンダリンセンター栽植のナガキンカン、マメキンカン (2x)、ナガバキンカン及びマルキンカン、本学温室栽植のニンポウキンカン及びフクシュウキンカンの6種を供試した。交配には、開花直前の花を用い、除雄後、前述した6種の花粉を用いてそれぞれ4~12花受粉し、交配袋をかけた。収穫は、種子の成熟する11~12月にかけて行った。収穫後、全ての種子を摘出し、充実したものを「完全種子」、明らかに完全種子よりも小さいものを「小粒種子」とし、しいなの種子を「不完全種子」として、種子重を測定した。外種皮を除去した種子を、1% Tween20 添加の1% アンチホルミンで10分間浸漬滅菌処理後、30g/l シュークロース及び2g/l ジェランガムを添加した MT 培地 (Murashige・Skoog, 1962) に置床し、25°C, 38mmol・m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, 16時間条件下で約1ヶ月間培養した。発芽した実生は、パーミキュライトを入れたビニールポットへ移植し、ビニール袋に封入し、約10日間維持した後、徐々にビニール袋を破くことで順化した。実生の形態は順化8ヶ月後に観察した。

得られた実生の倍数性を調査するために、フローサイトメーター (EPICS XL; Beckman Coulter, Inc., CA, USA) による方法と酵素解離による染色体観察法を適用した。フローサイトメーターによる解析では、春崎ら (2000) の方法に従い、半数体の葉、花 (がく片、花弁および花糸) および果実 (砂じょう, アルベドおよびフラベド) の各器官、組織を用いた。なお、対照区として「晩白柚」の成葉を供試した。採取した試料50mgに2ml chopping buffer [25mg・liter<sup>-1</sup> propidium iodide (PI), 50mM Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 140mM 2-メルカプトエタノール, 1% Triton X-100, 50mM トリス塩酸, pH 7.5] を加え、シャーレ上において約5分間細かく刻み、ミラクロス (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) でろ過した。ろ液を遠心分離 (12,000rpm, 3分間) し、上清を除去した後、沈殿物を550µl chopping buffer と混合し、よく懸濁した。さらに、測定直前に50µlの500mg・liter<sup>-1</sup> PI 溶液を加えて混合した後、フローサイトメーターで10,000個の核の蛍光強度により倍数性の判定を行った。

また、一部修正した Fukui (1996) の酵素解離による染色体観察法を適用し、半数体の幼葉の染色体数を調査した。すなわち、幼葉の先端0.5cmを採取し、2mM 8-ヒドロキシキノリンで4°C, 6時間前処理後、固定液 (エタノール: 酢酸=3:1) で4°C, 12時間固定した。固定後、根端を蒸留水で1時間水洗し、固定液を取り除き、2%セルラーゼ “オノヅカ” RS (Yakult Pharmaceutical Ind. Co., Ltd., Tokyo), 1%マセロザイム R-200 (Yakult Pharmaceutical Ind. Co., Ltd., Tokyo), 0.3%ペクトリアーゼ Y-23 (Kyowa Chemical Products Co., Ltd., Osaka) および200mM EDTA を含む酵素液を用い、根端を37°C, 10

分間酵素解離した。解離後、根端をプレパラートに移し、固定液を加え展開し、染色体標本を作成した。プレパラートを室温で乾燥させた後、2%ギムザ液で30分間染色した。プレパラートを蒸留水で水洗し、乾燥させた後、光学顕微鏡を用いて染色体を観察した。

種間交雑を行った結果 (Table 1-1.)、種子親がマルキンカンとナガバキンカンの場合を除き、ほとんどの組合せで果実を得ることができた。しかし、マルキンカンとナガバキンカンについては、ほとんどの組み合わせで着果が認められず、着果した果実にも種子は全く存在しなかった。これは、実験樹の生育状態が不良であったことと台風の被害によるものと思われた。

多胚性キンカンを種子親とした種間交雑を行った結果、完全種子出現率や発芽率が高かったが、一部低い組み合わせもあった。得られた実生のほとんどが健全な形態を示したが、形態的特徴から珠心胚実生と雑種実生とを区別することは困難であった。しかしながら、ナガバキンカンやマメキンカンなど特異な形態を持つ種が花粉親の組み合わせでは、一部ではあったが区別することができた。

ニンポウキンカンが種子親の組み合わせでは、マメキンカンを除くすべての組合せで果実が得られ、完全種子出現率も80%以上であり、発芽率も高かった。また、フクシュウキンカンを種子親とした組み合わせでも、マメキンカンを除くすべての組合せで果実が得られ、多数の実生が得られた。

マメキンカンを種子親とした組み合わせでは、すべての組合せで着果が認められたが、ナガバキンカンでは着果率や1果実あたりの種子数が低く、それぞれ33.3%と1.5個/果であった。また、マルキンカン花粉親とした交雑組み合わせでは、他の組合せと比較して不完全種子が多く、完全種子出現率は57.5%と低かった。平均種子重についてもマルキンカンで低く、放任受粉区で約100mgであったのに対し、約半分程度の55.6mgであった。

さらに、発芽率も他の4種を花粉親に用いた組み合わせでは80%以上であったが、マルキンカンでは38.5%と最も低かった。発芽した実生は、マルキンカンが特徴的な葉を持っているにもかかわらず、花粉親との中間的な形態をもつ実生は観察されなかった。

単胚性のナガキンカンが種子親の交配組み合わせでは、すべての組み合わせで完全種子を得ることができた。着果率は花粉親間でほとんど差異は観察されなかったが、1果あたりの種子数には差異が認められた。1果実あたりの種子数は、放任受粉区で3.9個であったのに対し、花粉親にマメキンカンを用いた交配組み合わせで4.3個、ニンポウキンカンとフクシュウキンカンでは1.3個であった。また、ニンポウキンカンでは不完全種子が多く、完全種子出現率は36.4%であった。得られた種子の発芽率はマルキンカンやマメキンカンで高く、両種とも70%以上であったが、ニンポウキンカンとフクシュウキンカンでは低く、それぞれ50と40%であった。すべての交配組合せで、実生を得ることができたが、ナガバキンカンまたはマメキンカンが花粉親である実生は両親の中間の形態を示し、視覚的にも雑種であることが判断できた。しかしながら、すべて二倍体雑種であり、非還元配偶子が関与した実生は得られなかった。

Table 1-1 Seeds and their germination obtained from interspecific crosses in *Fortunella* species.

Parent		No. of flowers pollinated	No. of fruits obtained	% of fruit set <sup>a</sup>	No. of seeds				No. of seeds per fruit <sup>b</sup>	% of normal seeds <sup>c</sup>	Av. seed wt. (mg)				No. of germination				Germination rate (%) <sup>d</sup>	No. of plants obtained <sup>e</sup>
Seed	Pollen				Normal	Small	Total	Undeveloped			Total	Normal	Small	Undeveloped	Normal	Small	Total	Undeveloped		
Oval kumquat	Round kumquat	10	4	40.0	11	0	11	4	2.8	73.3	64.3	64.3	—	14.5	8	—	8	—	72.7	6
	Meiwa kumquat	10	3	30.0	4	0	4	7	1.3	36.4	94.0	94.0	—	12.1	2	—	2	—	50.0	1
	Malayan kumquat	10	4	40.0	10	4	14	5	3.5	52.6	62.4	78.6	21.8	10.2	9	—	9	—	64.3	10
	Changshou kumquat	10	4	40.0	5	0	5	5	1.3	50.0	70.0	70.0	—	30.0	2	—	2	—	40.0	2
	Hongkong kumquat	10	4	40.0	17	0	17	2	4.3	89.5	80.0	80.0	—	20.0	6	—	6	—	80.0	11
Round kumquat	Oval kumquat	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Meiwa kumquat	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Malayan kumquat	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Changshou kumquat	10	2	20.0	0	0	0	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Hongkong kumquat	10	1	10.0	0	0	0	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Meiwa kumquat	Oval kumquat	10	6	60.0	35	0	35	5	5.8	87.5	112.0	112.0	—	29.2	34	1	35	—	100	114
	Round kumquat	10	1	10.0	3	0	3	0	3.0	100	119.3	119.3	—	—	3	—	3	—	100	3
	Malayan kumquat	10	3	30.0	20	0	20	1	6.7	95.2	108.3	108.3	—	55.0	20	—	20	—	100	111
	Changshou kumquat	11	4	36.4	21	0	21	3	5.3	87.5	96.5	96.5	—	44.3	18	—	18	—	85.7	69
	Hongkong kumquat	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Malayan kumquat	Oval kumquat	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Round kumquat	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Meiwa kumquat	10	1	10.0	0	0	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Changshou kumquat	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Hongkong kumquat	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Changshou kumquat	Oval kumquat	12	6	50.0	48	2	50	2	8.3	92.3	173.0	178.9	31.5	64.0	35	1	36	1	72.0	150
	Round kumquat	10	2	20.0	2	0	2	2	1.0	50.0	137.5	137.5	—	36.0	—	—	—	2	0	14
	Meiwa kumquat	10	1	10.0	10	3	13	0	13.0	76.9	112.2	135.3	35.0	—	9	3	12	—	92.3	31
	Malayan kumquat	10	1	10.0	5	0	5	0	5.0	100	130.8	130.8	—	—	5	—	5	—	100	30
	Hongkong kumquat	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Hongkong kumquat	Oval kumquat	10	4	40.0	9	0	9	1	2.3	90.0	112.8	112.8	—	9.0	9	—	9	—	100	55
	Round kumquat	10	5	50.0	10	3	13	5	2.6	55.6	57.5	74.8	26.7	42.4	4	1	5	—	38.5	6
	Meiwa kumquat	10	10	100	15	3	18	0	1.8	83.3	81.7	98.1	57.7	—	15	—	15	—	83.3	81
	Malayan kumquat	6	2	33.3	3	0	3	1	1.5	75.0	88.3	88.3	—	6.7	3	—	3	—	100	6
	Changshou kumquat	10	8	80.0	25	0	25	5	3.1	83.3	94.2	94.2	—	16.4	25	—	25	—	100	149

<sup>a</sup>% of fruits set = no. of fruits obtained / no. of flowers pollinated<sup>b</sup>No. of seeds per fruit = no. of total seeds / no. of fruits set<sup>c</sup>% of normal seeds = normal seed / (no. of total seeds + undeveloped seeds)<sup>d</sup>Germination rate = no. of seeds germinated / no. of seeds<sup>e</sup>No. of obtained plants were conduced mucellar seedling.

## 2. カンキツ品種‘清見’および‘南風’とキンカン属との属間交雑における予期しない倍数体の発生

種子親には、熊本県農業研究センター果樹研究所栽植の‘清見’タンゴール（‘宮川早生’×‘トロビタ’オレンジ）の成木及び宮崎県宮崎市古城町奥野安弘氏栽植の‘南風’（‘清見’×‘フェアチャイルド’）を用いた。花粉親として、前年の7～8月に採取したナガキンカン、マルキンカン、ニンポウキンカン、ナガバキンカン、フクシュウキンカン、マメキンカン及びシキキツの貯蔵花粉を用いた。なお、それぞれの花粉は、春崎(1996)の方法に従い、-35℃の冷凍庫で約1年間保存した。交配は、10花以上について行い、交配方法は、前述した方法と同様とした。また、開花直前に採取した花粉と1年間貯蔵した花粉の稔性調査を行った。また、前述した方法と同様に、実生を培養、順化した。獲得された実生の倍数性は、前述した染色体観察およびフローサイトメーター法により決定した。

まず、1年間貯蔵した花粉の稔性を調査した結果、いずれの種も開花直後の値に比べ減少したが、ナガキンカン、ニンポウキンカン及びフクシュウキンカンでは、10%以上であり、交配には十分な稔性を示した、しかしながら、ナガバキンカン、マルキンカン及びマメキンカンの花粉は、開花直後の稔性も低く、貯蔵後は5%以下まで減少した。

これらの貯蔵したキンカン属各種の花粉を用いて‘清見’タンゴールを種子親に属間交雑を行った結果 (Table 1-2)、フクシュウキンカンでやや低かったものの (15.8%)、他の組合せでは、いずれも20%以上の着果率を示した。しかしながら、マルキンカンとマメキンカンとの交雑では種子は得られず、ナガキンカンとニンポウキンカンとの交雑では、得られた果実の1果あたりの種子数がそれぞれ0.3と0.4個と少なかった。一方、ナガバキンカンの交雑では、1果あたりの種子数は極めて多く、13.0 (放任受粉区で7.0個) 個であった。また、それらの種子のほとんどは完全種子であり、その出現率は87.3%であった。属間交雑から得られた種子はほとんどが正常に発芽し、種子親として供試した‘清見’が単胚性であることから、これらの実生はいずれも属間雑種であることが期待できる。

次に、‘南風’を種子親に属間交雑を行った結果 (Table 1-2)、‘清見’の場合と同様に、マルキンカンおよびマメキンカン以外の花粉親で完全種子が得られた。ニンポウキンカンとの交雑では、1果実あたりの種子数が0.3個と少なかった。しかしながら、完全種子が得られた組み合わせではすべて実生を獲得することができた。

‘清見’とニンポウキンカンとの属間雑種の倍数性を調査したところ、2個体とも三倍体であった。一方、‘南風’とニンポウキンカンとの属間雑種は、2個体とも二倍体であった。おそらく、‘清見’とニンポウキンカンとの属間雑種は、雌性の非還元配偶子が関与していると推測され、今後、ゲノム構成について調査していく必要がある。

‘清見’とニンポウキンカンの2系統はカラタチ台木に接ぎ木した。葉が厚く、トゲが強いなどの三倍体の特徴が示された。5年経過した現在もまだ開花、結実していない。

Table1-2 Fruit set and seed contents in the crosses between *Citrus* cultivars and *Fortunella* species.

Cross combination		No. of flowers Pollinated	No. of fruits set	% of fruits set	Av. fruit wt. (g)	No. of seed		No. of developed seeds per fruit	% of developed seeds <sup>2</sup>
Seed parent	Pollen parent					Developed	Undeveloped		
'Kiyomi' tangor	Open pollination	—	10	—	275.2	136	6	13.6	9 5.8
	Meiwa kumquat	20	5	25.0	370.8	2	7	0.4	2 2.2
	Oval kumquat	30	7	23.3	262.9	2	0	0.3	10 0
	Malayan kumquat	22	6	27.3	358.2	76	11	12.7	8 7.4
	Round kumquat	20	5	25.0	384.2	0	0	—	—
	Hongkong kumquat	20	8	40.0	329.0	0	0	—	—
	Changshou kumquat	19	3	15.8	334.7	12	0	4.0	10 0
	Calamondin	30	15	50.0	334.7	53	5	3.5	9 1.4
'Nanpu' tongor	Open pollination	—	10	—	306.0	57	10	5.7	8 5.1
	Meiwa kumquat	56	6	10.7	186.0	2	0	0.3	10 0
	Oval kumquat	30	4	13.3	187.3	19	0	4.8	10 0
	Malayan kumquat	15	7	46.7	367.9	115	33	16.4	7 7.7
	Round kumquat	15	1	6.7	231.2	0	0	—	—
	Hongkong kumquat	25	1	4.0	226.8	0	0	—	—
	Changshou kumquat	35	4	11.4	284.0	36	1	9.0	9 7.3
	Calamondin	30	5	16.7	241.2	31	2	6.2	9 3.9

<sup>2</sup>(Developed seed / total seed) × 100.

## 2. ニンポウキンカンの有糸分裂阻害剤処理による四倍体の育成

1) 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.

ニンポウキンカンの種子を用いた試験管内染色体倍加について検討した. 有糸分裂阻害剤であるコルヒチンとオリザリンを様々な濃度や時間で種子に処理し, その後 500 mg·liter<sup>-1</sup> 麦芽抽出物を添加した MT 培地で培養した. 処理 2 か月後, 発芽率を調査し, フローサイトメーターと根端の染色体観察により得られた実生の倍数性を解析した. 四倍体実生率は有糸分裂阻害剤の種類, 処理濃度および時間に依存しており, 本処理条件内では, コルヒチンの方がオリザリンより染色体倍加の効果が高かった. 0.05%, 48 時間でコルヒチン処理を行った時, 約 50%と最も高い頻度で四倍体を獲得することができた. これらの四倍体の初期生長は貧弱であったが, 3 年生のカラタチ台に接ぎ木すると二倍体と同様に旺盛な成長を示した. 以上のように, 胚培養を組合せた種子へのコルヒチン処理は, ニンポウキンカンの四倍体を効率的に誘導できることが明らかとなった.

### 公表論文参照 (23~29 ページ)

八幡昌紀、柏原夕希子、國武久登、小松春喜：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. 園芸学研究, 3 巻, 1 号, 11-16 (2004)

## 3. 二倍体と四倍体との種属間交雑における予期しない倍数体の発生

1) '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

'晩白柚' を用いた三倍体育種を効率的に進めるために, 二倍体と四倍体間での正逆交雑から得られた種子の重さとその倍数性との関係を調査した.

‘晩白柚’に四倍体ユズまたは四倍体ナツダイダイを交雑したところ、完全種子出現率が対照区（放任受粉果）と比較してそれぞれ 48.0%と 8.4%まで減少した。それらの実生の倍数性を調査した結果、三倍体と四倍体が確認され、前者の組合せからは六倍体が 1 個体得られた。‘晩白柚’×四倍体ユズでは三倍体の発生率が高く（88.0%）、‘晩白柚’×四倍体ナツダイダイでは低かった（30.2%）。二倍体×四倍体の両組合せから得られた三倍体と四倍体の平均種子重は、三倍体が四倍体より有意に軽いことが明らかとなった。さらに、これらの組合せから得られた不完全種子を培養した結果、得られた実生はすべて三倍体であった。

一方、四倍体ユズおよび四倍体ナツダイダイに‘晩白柚’を交雑した結果、放任受粉果と比較して、それぞれの完全種子出現率には大きな差異は観察されなかったものの、種子重は有意に減少した。三倍体は、珠心胚由来と考えられる四倍体に混じって、それぞれの組合せで約 50%の頻度で得られた。三倍体が発生した種子とそれ以外の種子の重さには有意な差異は観察されなかった。

公表論文参照（30～36 ページ）

八幡昌紀、岡信孝、國武久登、小松春喜：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。園芸学研究、2 巻、4 号、247-252 (2003)

## 2) 単胚性カンキツと四倍体ニンポウキンカンとの属間交雑

四倍体ニンポウキンカン、つまり興津系、串間系、H9-1006 および H9-1008 を花粉親として、単胚性カンキツ品種である‘清見’と‘南風’との交雑を行った。その結果、両品種ともいくらの着果が認められたが、果実中にまったく完全種子はなく、‘南風’との交雑でいくつかの不完全種子が得られたのみであった。不完全種子は、前述した方法により、胚培養を行ったが、発芽は観察されなかった。

Table1-3 Fruit set and seed contents in the crosses between *Citrus* cultivars and four tetraploid meiwai kumquats.

Cross combination		No. of flowers Pollinated	No. of fruits set	% of fruits set	Av. fruit wt. (g)	No. of seed		No. of developed seeds per fruit	% of developed seeds <sup>a</sup>
Seed parent	Pollen parent					Developed	Undeveloped		
'Kiyomi' taogor	Open pollination	—	10	—	275.2	136	6	13.6	9 5.8
	Okitsu	10	1	10.0	285.2	0	0	0.0	0
	Kushima	10	0	0.0	—	—	—	—	—
	H9-1006	10	1	10.0	200.0	0	0	0	0
	H9-1008	10	3	30.0	285.4	0	0	0	0
'Nanpu' tangor	Open pollination	—	5	—	311.0	13	26	2.6	3 3.3
	Okitsu	20	6	30.0	305.0	0	11	0	0
	Kushima	20	3	15.0	291.7	0	0	0	0
	H9-1006	20	2	10.0	447.5	0	7	0	0
	H9-1008	20	2	10.0	270.0	0	2	0	0

<sup>a</sup>(Developed seed / total seed) × 100.

## II. カンキツ半数体植物の形態的および遺伝学的特性とその部分ゲノム導入への利用

カンキツ類の細胞融合による体細胞雑種の育成は、交雑不和合の組み合わせも含めて250例を超えている。しかしながら、現在までに栽培品種として登録された例はない。その理由として、体細胞雑種が対称融合の結果、育成された四倍体であり、果皮や酸高などの好ましくない形質が発現するからである。最近、二倍体と半数体を細胞融合することにより、三倍体が育成されており、その果実の形質が注目されている。また、我々は小粒種子から発生した‘晩白柚’の半数体を育成し、農林水産省から譲渡いただいたクレメンティンと‘リー’半数体とともに維持保存している。本研究では、現在までに世界的にも開花結実の例がないカンキツ半数体の遺伝的特徴を明らかにするとともに、その部分的な導入のための細胞融合についても検討した。

### II-1. 半数体の特徴とその後代実生の倍数性評価

#### 1) 晩白柚半数体の形態的特徴

カンキツ類における半数体植物の基礎的情報を得るために、ブントン品種である‘晩白柚’から得られた半数体における葉、花、花粉および果実の形態を調査した。また、半数体の倍数性が維持されているかを調査するために、フローサイトメーターにより半数体の葉、花および果実などの様々な器官、組織の倍数性の解析を行った。

半数体の葉、花および花粉は、‘晩白柚’と比較して有意に小さく、奇形の花が多く観察された。半数体の花粉稔性について調査した結果、‘晩白柚’と比較して著しく低かったが、わずかながら稔性が認められた。一方、果実は‘晩白柚’と比べ、1/8程度の重さであり、非常に小さくなっていた。また、種子の形成は認められなかった。

次に、半数体の葉、花および果実の各器官、組織において、フローサイトメーターで解析した結果、半数体の葉、がく片、花弁、花糸、砂じょう、アルベドおよびフラベドともに相対蛍光強度が‘晩白柚’と比較して半数性を示した。さらに、半数体の幼葉の染色体数を観察した結果、調査したすべての細胞において9本の染色体数が確認された。これらの結果より、この半数体は調査したすべての器官および組織において半数性を維持していることが明らかとなった。

公表論文参照 (37~43 ページ)

Yahata, M., S. Harusaki, K. Takami, P. Toolapong, H. Kunitake, T. Yabuya, K. Yamashita and H. Komatsu: Morphological characterization and molecular verification of a fertile haploid pummelo (*Citrus grandis* Osbeck). *J. Amer. Soc Hort Sci* 130(1):34-40 (2005)

#### 2) カンキツ単胚性品種と‘晩白柚’半数体との交雑

ブントン品種である‘晩白柚’の実生から得られた半数体における雌性および雄性配偶子の生殖機能を評価するために、半数体と種々の二倍体カンキツ品種との交雑を行った。半数体に二倍体の花粉を授粉した場合には全く着果しなかったが、半数体を花粉親とした場合、‘清見’、‘南風’、‘宮内’イヨカンおよび‘土佐文旦’の4品種で完全種子が得られた。これらの完全種子を播種したところ、それらのほとんどは正常に発芽し、多くの二倍体実生が得られた。これらの実生は旺盛に成長し、‘晩白柚’の形態的特徴である大きな

翼葉を有していた。さらに、‘清見’と半数体との交雑から得られた 1 個体の実生について、RAPD 分析を行った結果、その実生はそれぞれの両親に特異的なバンドを有していた。また、CMA 染色による染色体構成を解析したところ、半数体由来と考えられる A 型染色体がその実生に遺伝されていたため、雑種であることが確認された。これらの結果から、本半数体では正常な花粉 ( $n=9$ ) が形成されていることが明らかとなった。

公表論文参照 (44~52 ページ)

Yahata, M., H. Kurogi, H. Kunitake, K. Nagano, T. Yabuya, K. Yamashita and H. Komatsu: Evaluation of reproductive function in a haploid pummelo by crossing with several diploid citrus cultivars. *J Japan Soc Hort Sci (in press)*

### 3) キンカン単胚性種と‘晩白柚’半数体との交雑

日本で保存されているキンカン属植物において唯一の単胚性種であるナガキンカンと‘晩白柚’半数体との交雑を行った。その結果、まったく着果は認められなかった。

### 4) 非還元雌雄性配偶子の発生要因の解明

半数体は 1 組の染色体のみからなり、染色体接合の相手となる相同染色体をもたない。半数体の減数分裂は、第一減数分裂中期に一価染色体のみの出現が一般的であり、第一減数分裂後期にそれらの一価染色体が機械的に両極に分配される。そのため、半数体は減数分裂が行われても不稔となる。

しかしながら、植物の種類によってはしばしば半数体植物で稔性のある配偶子を形成することが報告されている (Hesse, 1971; Crane ら, 1982; Veilleux, 1985; Zagorcheva ら, 1987; Yan ら, 2000)。果樹では、モモの半数体においてわずかではあるが雌性と雄性配偶子それぞれに生殖能力があることが報告されている (Hesse, 1971; Pooler・Scorza, 1995a)。半数体植物における配偶子の稔性回復機構として、第一減数分裂後期にすべての染色体が同一極に移動した場合や退行現象による復旧核の形成、第二分裂後の核融合、紡錘糸の形成方向の平行などが報告されている (Hesse, 1971; Pooler・Scorza, 1995a; Veilleux, 1985; Yan ら, 2000)。

本研究で用いているブンタン半数体は、前の実験において本半数体に花粉および胚珠の形成が観察され、わずかながら花粉に稔性があることが認められた。さらに、種々の二倍体カンキツ品種との交雑を行ったところ、正常な花粉 ( $n=9$ ) が形成されていることが明らかとなった。しかしながら、その雄性配偶子の稔性回復機構や雌性配偶子の形成過程についてはまったく明らかにされていない。

そこで本研究では、ブンタン半数体の雄性および雌性配偶子における減数分裂について詳細な細胞遺伝学的解析を行い、その形成過程を調査した。

材料には接木約 10 年生のブンタン半数体と約 10 年生の‘晩白柚’を供試した。

雄性配偶子形成の観察については、山下・山口 (1992) の方法に従い行った。すなわち、開花 2 週間前から半数体と‘晩白柚’の花蕾を経時的に採取し、FAA (70%エタノール: 酢酸: ホルムアルデヒド=90: 5: 5) で固定した。固定後、葯中から種々の发育ステージにある小胞子をスライドガラス上に取り出し、核染色を行って蛍光顕微鏡下で花粉母細胞や減数分裂の過程について観察した。また、四分子期には 1 花粉母細胞に由来する小胞子

数を数えた。なお、核染色は  $1\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$  4'-6-diamidino-2-phenyl-indole (DAPI) で行った。

花粉稔性の調査は、2004年5月に開花直前の花蕾から取り出した葯を常法により開葯し、前の実験と同様に1%アセトカーミン染色により評価した。なお、花粉稔性調査は3反復行い、1反復あたり1000個以上の花粉を調査した。

ハッサクを交配した半数体の花を用い、半数体の雌ずい内における花粉管伸長について調査した。交配後1日から8日までの花を採取し、FAAで固定した。固定後、1N NaOHに1時間浸漬し、水洗した。花を柱頭、花柱上部、花柱中部、花柱下部および子房に分け、Martin (1958)の方法に従い、0.1%アニリンブルー/1N  $\text{KPO}_3$ に5°Cで一昼夜浸漬・染色し、蛍光顕微鏡で観察を行った。なお、'晩白柚'にハッサクを交配したものを対照区とした。

雌性配偶子形成の観察は、雄性配偶子形成の観察と同様に、開花2週間前から半数体と'晩白柚'の花蕾を経時的に採取し、FAAで固定した。固定後、それぞれの花卉と雌ずいを取り除き、子房を常法に従いエタノールとブタノールで脱水し、パラフィンで包埋した。包埋後、回転式マイクロトームで厚さ15 $\mu\text{m}$ の連続縦断切片を作成し、サフラニンとファーストグリーンで二重染色を行った。これらの連続切片は、光学顕微鏡を用いて胚珠の縦経と横径を測定するとともに胚珠の内部形態を観察した。

半数体における減数分裂過程を調査した結果 (Fig. 2-1)、半数体は連続した2回の分裂を行っていた。第一減数分裂前期に核内に広がっていた染色質は凝縮を開始し、赤道面に一価染色体が出現し (Fig. 2-1b)、それらの一価染色体が不均一に両極に分配された (Figs. 2-1c, d)。その後、第二減数分裂に移り、各極に分配された一価染色体は核分裂を行い、染色分体は両極に分配された (Figs. 2-1e~g)。しかしながら、一部の分裂細胞では減数分裂の異常が認められた (Fig. 2-2)。第一分裂後期において、いくつかの一価染色体が両極に分配されず、赤道面付近に残るものが観察された (Figs. 2-2a, b)。また、周囲の細胞が第二減数分裂過程にもかかわらず、赤道面に9個の二価染色体が並列し、両極に分裂するものも観察された (Fig. 2-2c)。

花粉四分子期における半数体の小孢子型は一分子から六分子の小孢子が観察された。さらに、半数体が形成した二分子から六分子における小孢子的大きさを観察したところ、二分子では2つの小孢子的大きさがほぼ同じであったのに対し、三分子から六分子ではそれぞれの小孢子的大きさが不均一であった (Fig. 2-1h)。半数体と'晩白柚'の花粉四分子期における小孢子型の出現頻度を調査した結果、'晩白柚'では、三分子、四分子および五分子が観察されたが、99.3%が四分子であった。一方、半数体におけるそれぞれの小孢子的出現頻度は、一分子が1.1%、二分子が24.7%、三分子が11.8%、四分子が61.2%、五分子が1.1%および六分子が0.1%であり、'晩白柚'と比べ二分子と三分子が多く発生していた。

酢酸カーミンにより花粉稔性を調査した結果、'晩白柚'の染色稔性は97.5%であり、育成当時の結果 (98.0%) とほぼ同じであった。しかしながら、半数体における酢酸カーミンによる染色花粉の出現頻度は14.1%であり、半数体が初めて開花した3年前 (2001年5月) に測定した結果 (1.6%) より高くなっていた。おそらく半数体の樹勢が徐々に強くなってきたものと考えられる。今後、経時的に半数体の花粉稔性を調査していく必要がある。

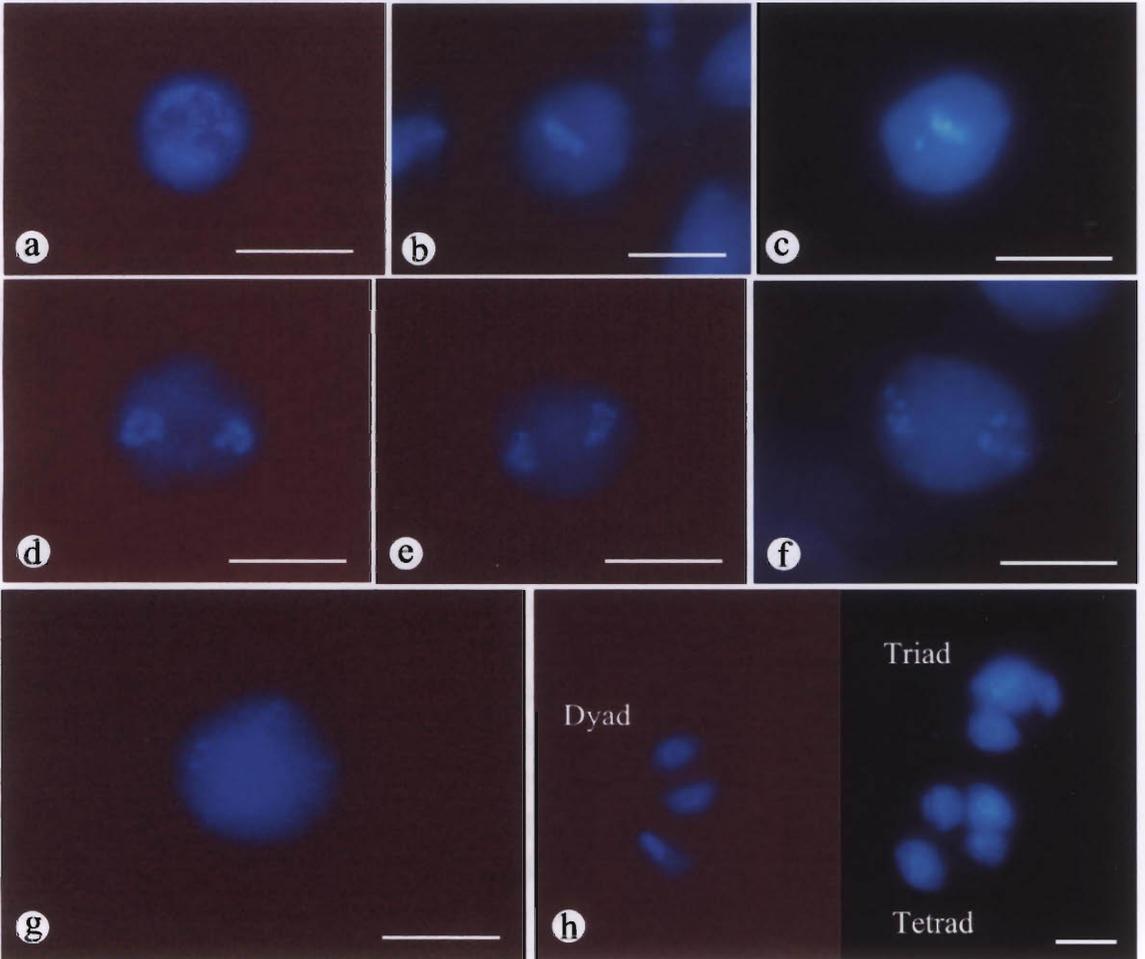


Fig.2-1 Meiotic stages of the haploid. Bars=10  $\mu$ m.  
 a : Prophase I. b : Metaphase I. c : Anaphase I.  
 d : Telophase I and prophase II. e : Metaphase II.  
 f : Telophase II. h : Tctrad stage.

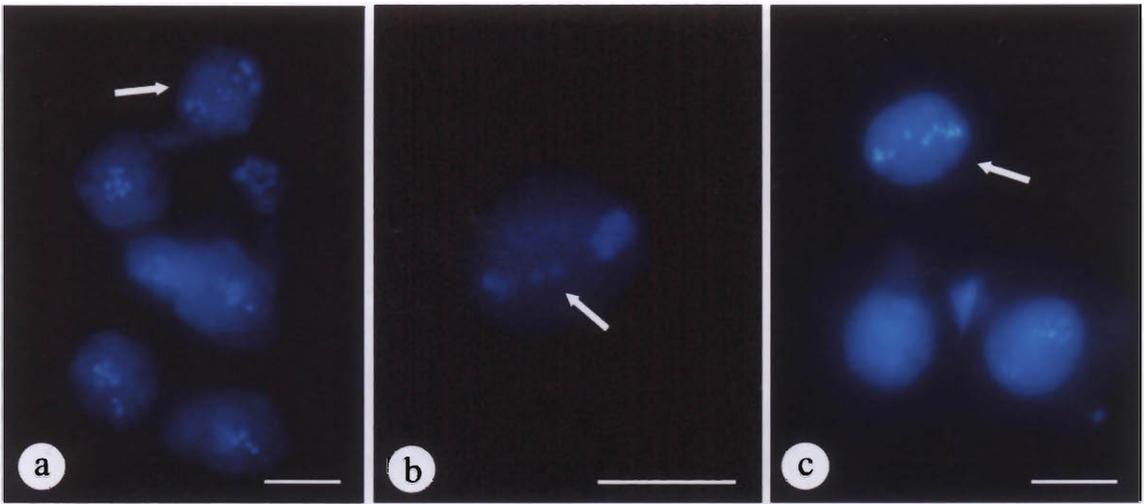


Fig. 2-2. Abnormalities of meiotic stage of the haploid. Bars=10  $\mu$ m.  
 Arrows indicate the abnormal cell.  
 a, b : Chromosomes remained in equatorial plane.  
 c : 9 bivalents lined in equatorial plane.

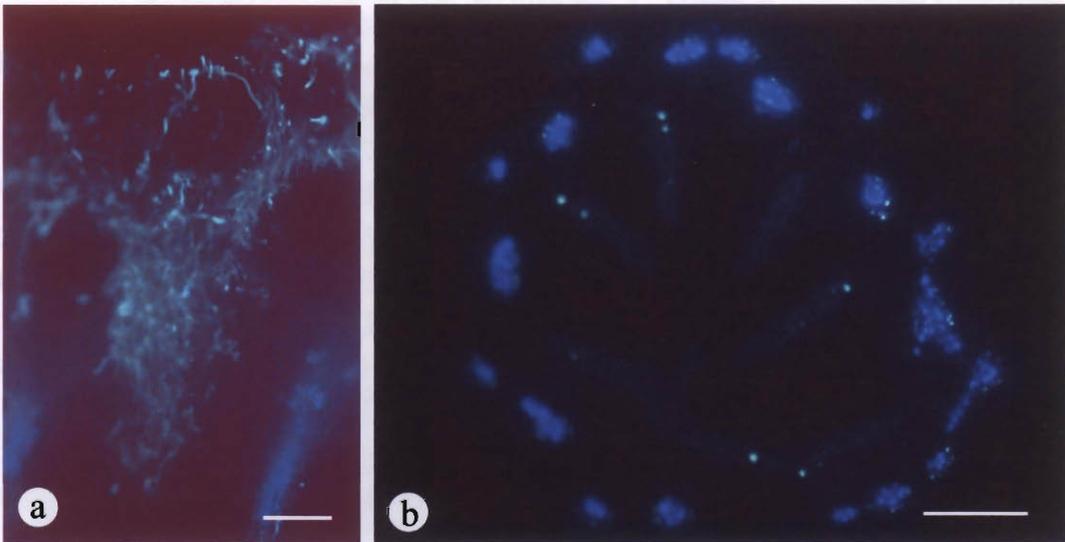


Fig. 2-3. Pollen tube elongation in pistil of the haploid. Bars=200  $\mu$ m.  
 a : Stigma. b : Base of the style.

これまでに、モモ、セイヨウアブラナ、トマトおよびトウガラシなどの半数体植物で稔性花粉の形成が認められている (Hesse, 1971; Veilleux, 1985; Pooler・Scorza, 1995a; Yan ら, 2000). 半数体植物における配偶子の稔性回復機構として、第一減数分裂後期にすべての染色体が同一極に移動した場合に稔性のある配偶子が出現する. その頻度は植物がもつ染色体数によって大きく変化するが、基本的に  $n$  本の一価染色体が  $2^n$  に分配されるため、 $1/2^n$  で稔性花粉の出現頻度を求めることができる. つまり、本半数体 ( $n=9$ ) では  $1/2^9$  となり、0.2%の確率で稔性のある花粉が形成されることになる. しかし、本章の結果では、稔性花粉は 14.1%であり、その期待される出現頻度よりはるかに高い値を示した. この原因の一つとして退行現象があげられる. 退行現象とは減数分裂が途中で停止し、形態的に静止核へ移ることであり、減数分裂過程で様々な時期に発生することが明らかとなっている. Yan ら (2000) は、半数体トウガラシを材料として稔性花粉の形成機構について調査したところ、第一減数分裂が行われずに復旧核を形成し、第二減数分裂だけを行う FDR により稔性花粉が形成したものと推察している. また、FDR が発生することによって形成される小孢子は二分子であることを報告している.

本研究では、ほとんどの細胞で第一減数分裂と第二減数分裂が行われていたが、一部の分裂細胞では減数分裂の異常が認められた (Fig. 2-2). 第一減数分裂後期においていくつかの一価染色体が両極に分配されず、赤道面付近に残るものが観察された (Figs. 2-2a, b). また、周りの細胞が第二減数分裂過程にもかかわらず、赤道面に 9 個の一価染色体が並列し、両極に 9 本ずつ染色体が分裂するものも観察された (Fig. 2-2c). さらに、花粉四分子期では、多くの二分子が出現していた. 二分子を稔性花粉と仮定すると、14.7%の頻度で稔性配偶子が発生することとなり、酢酸カーミン染色による花粉稔性調査の結果 (14.1%) とほぼ同じであった. 本研究においてもトウガラシと同様に稔性花粉が二分子由来であるかもしれない. おそらく、赤道面に 9 個の一価染色体が並列し、両極に 9 本ずつ染色体が分裂する細胞が二分子形成に寄与しているものと考えられ、このような減数分裂の異常は、本半数体においても FDR のような退行現象が起こっていることを示唆した.

次に、半数体の雌ずい内における花粉管伸長について調査した結果、交配後 1 日には、半数体の柱頭において多くのハッサク花粉の発芽が観察された (Fig. 2-3a). 花粉管は花柱溝に入り、交配後 2~3 日で花柱上部、交配後 4 日で花柱中部、交配後 5 日で花柱下部を通過し、交配後 6 日には花柱最下部までハッサクの花粉管が伸長していた (Fig. 2-3b). 一方、半数体の雌ずい内において花柱溝の形態異常が観察された. つまり、'晩白柚' では 1 雌ずいあたり 15 程度の花柱溝が確認され、それぞれ独立していたのに対し、半数体では雌ずいの中心部で花柱溝同士が結合していた. さらに、花粉管数を調査したところ、花柱上部では 100 以上の花粉管数が観察されたが、子房に近づくにつれ、その数は減少し、子房上部では、その数は極わずかであった. なお、半数体と '晩白柚' 間で花粉管の伸長速度に差は認められなかった.

胚珠の大きさを測定した結果、縦経はほぼいずれの時期も半数体が小さかった. 横経は開花前 4 日までは半数体の方が小さかったが、それ以降は '晩白柚' とほぼ同じ大きさであった. 次に胚珠の内部を観察した結果、'晩白柚' では開花前 12 日より胚のう母細胞が観察され (Fig. 2-4a)、その後、減数分裂→4 細胞→遊離核 (1~8 核) と発育が進み (Figs. 2-4b-f)、開花後 2 日には 1 胚珠あたり 1 個の完全胚のうが観察された (Fig. 2-4g). しかしながら、開花前 4 日頃までは未分化の胚珠が多く、胚のう母細胞以降の発育を示す胚珠は 20%程度であった. その後、開花日にかけて急激に胚のうの発達が認められ、開日前 2

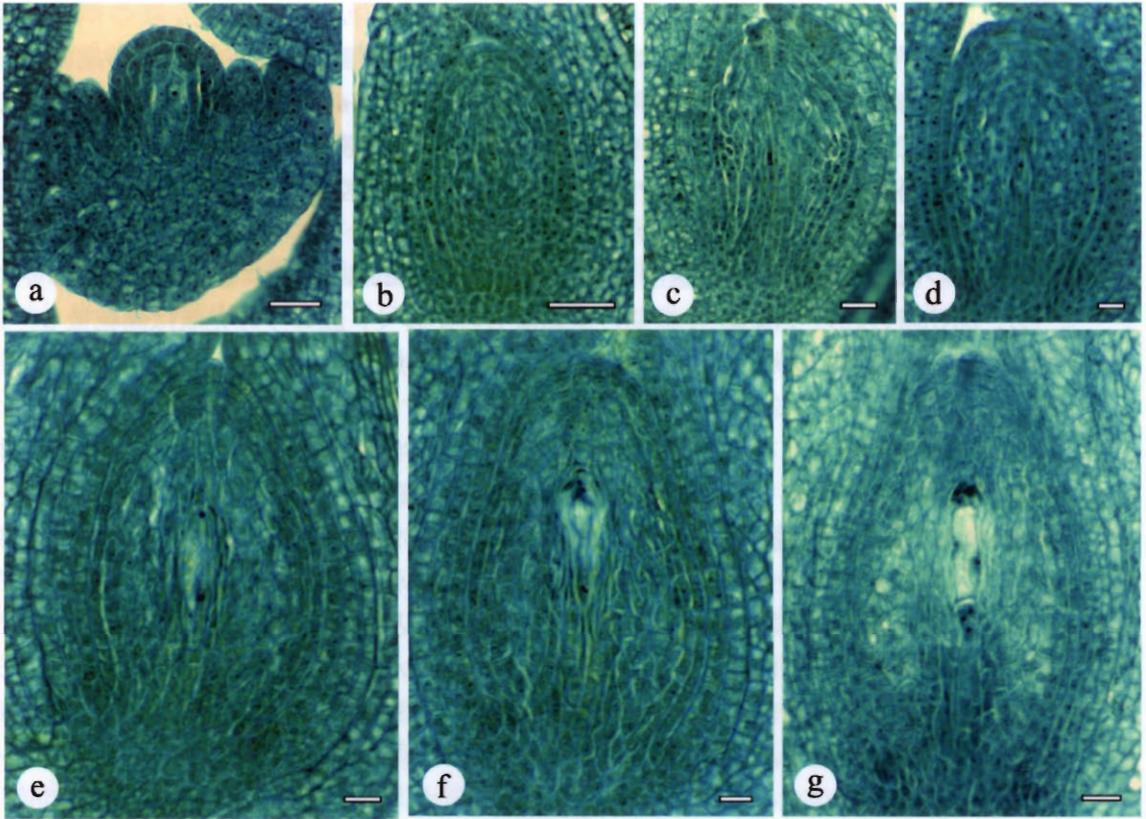


Fig. 2-4. Developmental stage of embryo sac in 'Banpeiyu' pummelo from 14 days before flowering to 2 days after flowering. Bars=10  $\mu$ m.  
 a : Embryosac mother cell. b : Meiosis. c : Tetrad. d : One-nuclei embryosac.  
 e : Two-nuclei embryosac. f : Four-nuclei embryosac. g : Eight-nuclei embryosac.

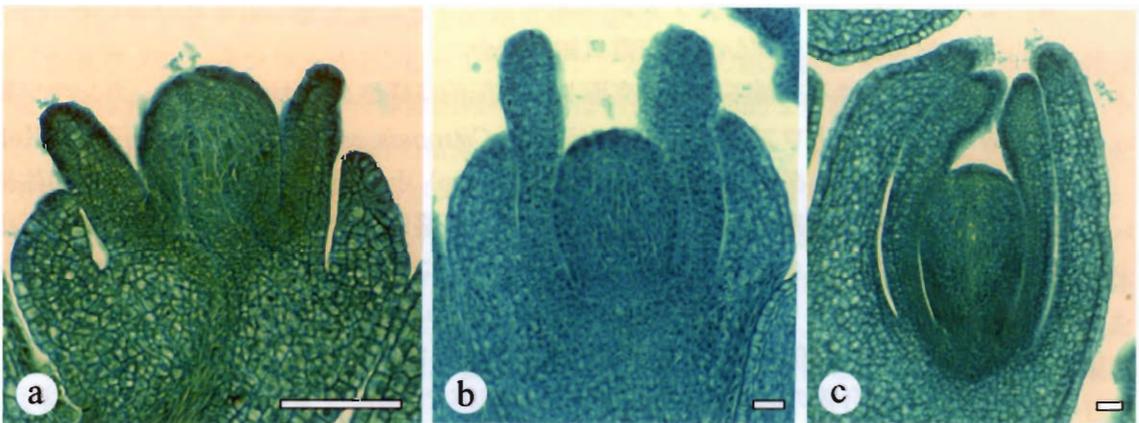


Fig. 2-5. Abnormalities of ovule in the haploid. Bars=20  $\mu$ m.  
 a : 14 days before flowering.  
 b : 4 days before flowering.  
 c : 2 days before flowering.

日より、2核期の胚のうが観察されるようになり、開花後2日には完全胚のうが25%程度確認された。一方、半数体では、開花前、開花日および開花後のいずれの時期においても正常に発達した胚のうは全く観察されなかった (Fig. 2-5a)。胚珠の外部形態についても、‘晩白柚’では外珠皮と内珠皮が発達した正常な形態であったが、半数体では内珠皮と外珠皮ともに外側に反り返るものや内珠皮と外珠皮の間に空隙を生じる胚珠など奇形のものが多く観察された (Figs. 2-5b, c)。

カンキツ類の花粉管伸長の速度は遅く、柱頭から胚珠に到達するまで5~6日要する。一方、開花時の胚のうは2~4核期の未熟なものが多く、胚のうの完成は開花後3~4日とされている (岩政, 1999)。本章では、半数体の雌ずい内におけるハッサクの花粉管伸長は、交配後6日には花柱最下部に到達し、ハッサクの花粉管は通常で伸長したが、花柱最下部に到達する花粉管数がわずかであった。半数体の雌ずい内は、花粉管が通る花粉溝が雌ずいの中心部で不規則に結合する異常が確認された。さらに、胚のうでは、開花後2日までしか観察を行っていないが、‘晩白柚’は胚のう母細胞が形成され、減数分裂を経て、開花後2日で低い頻度ではあるが完全胚のうが観察され、正常な雌性配偶子形成を行っていた。それに対し、半数体では、‘晩白柚’と比べ雌性配偶子形成異常が認められた。半数体は外珠皮と内珠皮が形成されるものの、いずれの時期においても胚のう母細胞については全く確認されなかった。前の実験において半数体の果実の形態的特徴を調査したところ、種子は全く形成されていなかった。また、半数体に種々の二倍体カンキツ品種の花粉を交配したが全く着果しなかった。おそらく、この原因として、柱頭上で花粉管が正常に発芽するものの、花粉溝の異常により花粉管の伸長が阻害され、たとえ花粉管が胚珠に到達しても胚のう母細胞が全く形成されないため、胚のう形成にいたらず、正常な受精が行えないためであると考えられる。

以上より、‘晩白柚’から得られた半数体の雄性および雌性配偶子形成において、雄性配偶子は第一減数分裂中に異常が起り、すなわちFDRのような退行現象が起り、稔性を回復しているものと推測された。また、半数体の雌性不稔の原因として、雌ずい中の花粉溝の異常と胚のう母細胞の無形成によることが明らかとなった。

## II-2. 細胞融合による部分ゲノムの導入

### 1) カンキツとシトロプシスとの電気細胞融合

カンキツにおける交雑不和合を克服し、遺伝的多様性を拡大するため、カンキツ属の先祖とされているシトロプシスガブネンシス (*Citropsis gabunensis* Swing. & M. Kell) と‘ショウゲン’マンダリン (*C. reticulata* Blanco) との電気細胞融合による属間体細胞雑種の育成を試みた。獲得された再生植物体は、旺盛に成育し、両親の間である三出葉を形成した。また、そのゲノムサイズは‘ショウゲン’マンダリン (0.75pg/2C) とシトロプシス (0.97pg/2C) をほぼ合わせた大きさである1.75pg/4Cを示しており、染色体観察を行ったところ、四倍体 ( $2n=4x=36$ ) と確認された。さらに、核DNA解析の結果、再生植物体は、両融合親の核DNAをもつ体細胞雑種であることが証明され、オルガネラDNAの解析により、シトロプシスのcpDNAと‘ショウゲン’マンダリンのmtDNAを有することが明らかになった。本実験で得られた体細胞雑種は、シトロプシス属とカンキツ属との類縁関係を探る一つの指標として、また、細胞融合による成分育種のための重要な素材になるものと思われる。

公表論文参照 (53～67 ページ)

Takami, K., A. Matsumaru, M. Yahata, H. Kunitake and H. Komatsu: Utilization of intergeneric somatic hybrids as an index discriminating taxa in the genus *Citrus* and its related species. *Sexual Plant Reproduction* (in press)

#### 2) ‘晩白柚’半数体とニンポウキンカンとの電気細胞融合

半数体と二倍体を電気細胞融合させ、直接的に非対称融合雑種を育成するために、‘晩白柚’半数体の葉肉プロトプラストとニンポウキンカンの珠心カルスプロトプラストとの電気細胞融合を行った。しかしながら、処理区からカルスは得られたものの、雑種と考えられる系統は確認できなかった。

#### 3) ネーブルオレンジとキンカンとの電気細胞融合

カンキツにおける交雑育種の問題点である遺伝的不稔性を打破し、特徴ある品種を育成するため、雌雄性不稔品種である‘森田ネーブル’オレンジとマルキンカン (*Fortunella japonica* Swingle) との珠心カルスプロトプラスト同士の電気細胞融合による属間体細胞雑種の作出を試みた。その結果、獲得された再生植物体は、両親の中間的な形態を示し、フローサイトメーターと染色体観察により、四倍体 ( $2n=4x=36$ ) であることが確認された。また、RAPD 法と CAPS 法による核 DNA の解析の結果、得られた再生植物体は、両親融合親の核 DNA を有する体細胞雑種であることが証明され、オルガネラ DNA の解析により、cpDNA と mtDNA は共にマルキンカン由来であることが明らかとなった。本実験で獲得された体細胞雑種は、遺伝的不稔品種の育種への利用を促進する貴重な中間母本になるものと思われる。

公表論文参照 (68～74 ページ)

Takami, K., A. Matsumaru, M. Yahata, H. Kunitake and H. Komatsu: Production of intergeneric somatic hybrids between round kumquat (*Fortunella japonica* Swingle) and Morita navel orange (*Citrus sinensis* Osb.). *Plant Cell Reports*, 23:39-45 (2004)

#### 4) カンキツとグレープフルーツとの電気細胞融合

‘ショウグン’タンゴールと L-1 グレープフルーツの組み合わせで非対称体細胞雑種を2個体育成した。それらの体細胞雑種の葉は両親と中間的な形態を示し、フローサイトメトリーによる DNA 量の解析の結果、三倍体であった。また、RAPD 法により核 DNA を分析すると、共に両親に特有のバンドを持っており体細胞雑種であることを確認できた。PCR-RFLP 法で cpDNA を解析したところ、本研究で用いた制限酵素では両親に特異的なバンドを観察することができなかった。本研究では、二倍体間融合により予期しない三倍体の非対称体細胞雑種が育成された。この発生源の解明のため、前処理した珠心カルスをフローサイトメーターにより DNA 量を解析したところ、半数体と思われるピークが観察された。このことにより、半数性プロトプラストが二倍性葉肉プロトプラストと融合し三倍体の体細胞雑種が育成されたと考えられた。

公表論文参照 (75～83 ページ)

Kunitake, H., K. Nagasawa, K. Takami and H. Komatsu: Molecular and cytogenetic

characterization of triploid somatic hybrids between Shougun mandarin and Grapefruit, Plant  
Biotechnology, Vol. 19, No. 5, 345-352 (2002)

### Ⅲ. マイクロプロトプラストによる部分ゲノムの導入

植物の花粉母細胞または培養細胞に分裂阻害剤を処理すると、異常分裂が誘導され、微小核を有する細胞が形成される。さらに、それらをセルラーゼ等の酵素処理を行うことにより、マイクロプロトプラストが単離でき、細胞融合を行うことにより  $2n + \alpha$  の生物体を育成することができる。本手法は、遺伝子組換えによる作物育種への批判が高まる中、染色体を有用遺伝子集団としたベクターと考える有望かつ独創的な育種手段である。しかしながら、本手法はタバコやペチュニアなどの実験植物のみに限られており、有用作物での成功例はない。そこで、ニンポウキンカン（ニホンキウキカン）の雄性配偶子からプロトプラストを単離し、二倍体培養細胞プロトプラストとの細胞融合について検討した。

#### 1) ニンポウキンカンからの花粉プロトプラストの単離

材料には、ニンポウキンカンを供試した。小孢子プロトプラストの単離条件を明らかにするために、酵素組成と精製について検討した。その結果、1%セルラーゼオノズカ R-10、0.5%マセロザイムオノズカ R-10、0.5%デキストラン硫酸カリウム、10mM 塩化カルシウム、0.6Mマンニトールを添加した酵素液で 25℃、暗黒条件下で 30 分間処理することによりプロトプラストを単離することができた (Fig.3-1a,b)。本条件下において、プロトプラストが単離できたものは、四分子期のみで、一核期以降のステージでは全く単離されず、破裂した。四分子期から単離されたプロトプラストは直径が均一であり、豊富な細胞質を有していた。プロトプラスト単離のために、酵素液中のマンニトール濃度と塩化カルシウムは重要な要因であり、マンニトール濃度は 0.6M、塩化カルシウムは 10mM で最も効率的に単離された。単離したプロトプラストは、0.65Mショ糖による遠心分離法で精製した。プロトプラストはショ糖液の上層に集まり、未消化のものは沈殿した。精製したプロトプラスト中には 10%以下で未消化花粉が混入していた。

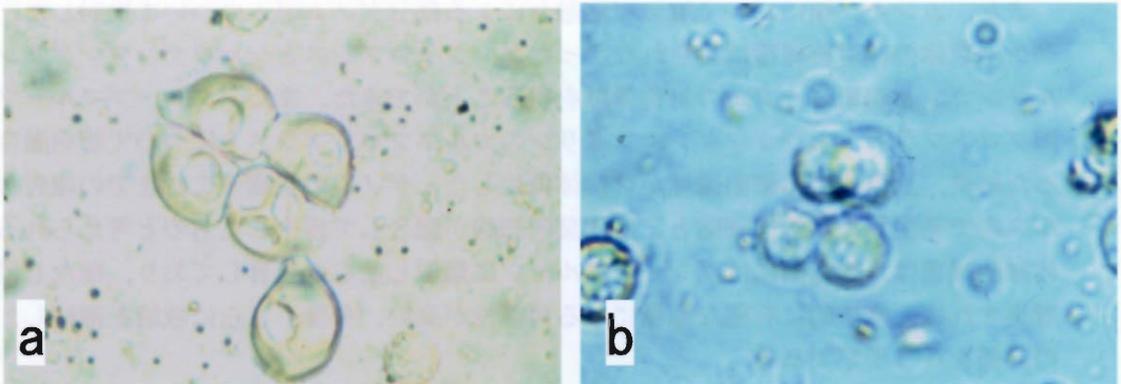


Fig.3-1 Isolation from tetrad pollen of Meiwa kumquat.

a. Tetrads

b. Release of microspore protoplasts

#### 2) ニンポウキンカンの花粉プロトプラストとカンキツ二倍体との電気細胞融合

単離したニンポウキンカンの花粉プロトプラストと‘ショウゲン’マンダリンのカルス由来プロトプラストとの電気細胞融合を行った。花粉プロトプラストとカルス由来のプロトプラストとの融合は低頻度ながら確認できたが、雑種細胞由来と推定されるカルスは得られなかった。

## 総合考察

キンカン属植物の育種は、カンキツ属と比較すると遅れており、現在までに登録されている品種は、‘ぷちまる’と‘こん太’の2品種のみである。緒言でもふれたように、まるごと食べられるようなカンキツ果実は少なく、機能性成分も豊富な素材としては注目すべき種である。また、宮崎県では、ニンポウキンカンの施設栽培が普及し、食味のよい完熟キンカンとして栽培、消費が伸びている。しかしながら、キンカンの育種はほとんど行われておらず、枝変わり等の突然変異にたよる部分が多い。

そこで、本研究では、非還元雌雄性配偶子が関与した非対称異質ゲノム雑種の育成、カンキツ半数体植物の形態的および遺伝学的特性とその部分ゲノム導入への利用、およびマイクロプロトプラストによる部分ゲノム導入について検討した。

まず、‘清見’タンゴールとニンポウキンカンとの交雑において、予期しない三倍体の雑種が2個体得られた。おそらく、‘清見’タンゴールの非還元型の雌性配偶子と正常なニンポウキンカンの雄性配偶子が受精し、発生したものと思われる。つまり、この雑種は、‘清見’タンゴールを2ゲノム、ニンポウキンカンをもつ1ゲノム持っているものと思われる。形態的にはニンポウキンカンタイプであり、葉は厚く、トゲは強い。現在までに、開花はしていないが、非対称ゲノムを有する三倍体属間雑種として貴重な育種母本であると思われる。今後、さらに栽培を続け、花や果実の調査を行う予定である。

次に、‘晩白柚’の小粒種子から得られたブンタン半数体の特性を調査した結果、わずかではあるが、稔性花粉が生じることが明らかとなった。また、単胚性カンキツを種子親としてブンタン半数体を交雑したところ、二倍体雑種が多数得られた。しかしながら、単胚性キンカンであるナガキンカンとの雑種は得られなかった。さらに、このブンタン半数体の新梢にコルヒチン処理を行うことにより、倍加半数体を育成した。倍加半数体はカンキツ類の遺伝解析を効率的に進めるにあたり、非常に有用な材料になると考えられる。

また、カンキツ類において電気細胞融合による部分ゲノム導入について検討した。ブンタン半数体の非対称雑種は得られなかったが、シトロプシスとショウグンマンダリン、マルキンカンと森田ネーブルの対称雑種を得ることができた。また、グレープフルーツの葉肉プロトプラストとショウグンマンダリンのカルスプロトプラストについて細胞融合を行った結果、三倍体の体細胞雑種が2個体再生した。ゲノムの状態やこれまでの報告からカルス内で発生した半数性細胞と二倍体葉肉細胞が融合して再生したものと考えられる。本体細胞雑種は、形態的にはグレープフルーツに類似したものを有しており、種なし果実が着果すれば、直接的に有望な品種になる可能性が高い。今後、さらに栽培を継続し、果実の評価を行う予定である。

さらに、カンキツの四分子期の花粉を材料として、小孢子プロトプラストを単離した。他のステージでは単離できなかったが、四分子期のみ可能であった。一方、カルス細胞または懸濁培養細胞への有糸分裂阻害剤処理による多核化、マイクロプロトプラスト化は安定的なシステムを構築できなかった。再度、詳細に検討していく予定である。

以上のように、交雑や細胞融合を利用して非対称での雑種を育成することができた。今後は、これらの個体の詳細な遺伝的解析を行うと共に、果実評価を行っていく予定である。