

半数体ブントンの形態的特徴と  
その生殖機能に関する研究

Studies on morphological characterization of a haploid pummelo and  
its reproductive function

八 幡 昌 紀

2006

## 目 次

序章	1
第 1 章 半数体ブントンの形態的特徴	6
1. 緒言	6
2. 材料および方法	7
3. 結果および考察	10
4. 摘要	14
第 2 章 半数体ブントンの生殖機能の評価	30
1. 緒言	30
2. 材料および方法	31
3. 結果および考察	33
4. 摘要	38
第 3 章 半数体ブントンの配偶子形成の異常	47
1. 緒言	47
2. 材料および方法	48
3. 結果および考察	49
4. 摘要	55
第 4 章 新梢へのコルヒチン処理による倍加半数体の育成	65
1. 緒言	65
2. 材料および方法	66

3. 結果および考察 . . . . . 67

4. 摘要 . . . . . 72

第 5 章 総合考察 . . . . . 80

要約 . . . . . 87

英文要約 . . . . . 91

謝辞 . . . . . 96

引用文献 . . . . . 97

## Certification

We, the undersigned, herewith certify that this dissertation, entitled 'Studies on morphological characterization of a haploid pummelo and its reproductive function' was not previously presented for the award of degree, and those experiments contained herein were independently conducted by Masaki Yahata under our supervision, and hereby submitted to the United Graduate School of Agricultural Sciences, Kagoshima University, Japan in partial fulfillment of the requirements for the award of Doctor of Philosophy (Ph. D.) degree is accepted for presentation.

Approve by :

 K. Yamashita

Kensuke Yamashita, Ph. D.

Professor of Pomology

University of Miyazaki

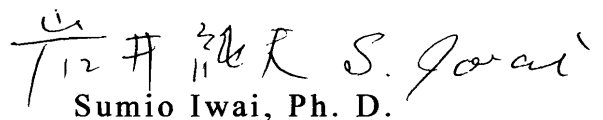
 Kunitake

Hisato Kunitake, Ph. D.

Associate Professor of

Plant breeding

University of Miyazaki

 S. Iwai

Sumio Iwai, Ph. D.

Professor of Plant breeding

Kagoshima University



田代 洋丞 *Tashiro*

Yosuke Tashiro, Ph. D.

Professor of Plant breeding

Saga University

藪谷 勤 *T. Yabuya*

Tsutomu Yabuya, Ph. D.

Professor of Plant breeding

University of Miyazaki

The United Graduate School of Agricultural Sciences

Kagoshima University

Japan

January, 2006

## 序章

カンキツ類とは、植物分類学上ミカン科 (*Rutaceae*), ミカン亜科 (*Aurantioideae*) に属するカンキツ属 (*Citrus*), キンカン属 (*Fortunella*) およびカラタチ属 (*Poncirus*) 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。カンキツ類の生産は現在でも増加傾向にあり、2004年のカンキツ生産量は、約1億854万トンと報告されており、果樹の中で世界一の生産量である (FAO, 2004)。現在、カンキツ類で主に栽培、生産されているのは、スイートオレンジ (*C. sinensis* Osbeck), マンダリン (*C. reticulata* Blanco), グレープフルーツ (*C. paradisi* Macf.), レモン (*C. limon* Burm. f.) およびライム (*C. aurantifolia* Swingle) などである。これらには数多くの品種が存在するが、それらのほとんどが生食または加工用として利用しやすい無核あるいは少核の特徴を有する。また、無核性以外に、高糖度、耐寒性、耐乾性、剥皮性、耐病性、早晩性および貯蔵性なども育種目標として掲げられており、さらに、最近では食生活の多様化と健康指向の高まりにより、美味しい果実であるとともに、その機能性食品としての二次代謝成分に対する関心が高まっており、健康機能性に着目した成分育種も行われている (Kato ら, 2004; Kawai ら, 2001; Ogawa ら, 2000; 山本ら, 1998)。

カンキツ類における主な育種方法には、ウンシュウミカン (*C. unshiu* Marc.) に代表される「枝変り」などを利用した突然変異育種法や「清見」, 「津之香」および「不知火」などを育成した交雑育種法があげられる (岩崎ら, 1966; 松本ら, 1991; 西浦ら, 1972; 1983)。

これらの育種法が現在栽培されているほとんどのカンキツ品種を育成したといっても過言ではない。その他，特徴的な育種法として小林ミカンや金柑子温州などで知られる接ぎ木キメラを利用した育種法や細胞融合，遺伝子組換えなどのバイオテクノロジーによる育種法などがある（Kobayashi ら，1988；1991；1995；Ohgawara ら，1985；1989；Sugawara ら，2002；Takami ら，2004；2005）。さらに，無核系統を効率的に育成する手法である三倍体育種に代表される倍数性育種があげられる（Recupero ら，2005；Soost・Cameron，1980；1985；徳永ら，2005；吉田ら，2003）。しかしながら，カンキツ類の育種を進める上での障害として，多胚性（上野ら，1967；奥代ら，1981），雌雄性不稔性（Iwamasa，1966；Nakano ら，2001；山本ら，1992a；1992b；Yamamoto ら，1997；Yamamoto・Tominaga，2002）および自家不和合性（Yamashita，1978；山下，1980）などがあり，さらに，果樹などの永年作物は，雑種性が強く，播種から開花結実に至るまで長年月を要するため，有用形質に関する遺伝情報が乏しく，計画的な育種の推進が困難である。

このような問題を克服するための方法の一つとして半数体育種法がある。半数体とは，細胞あたりの染色体数が通常の個体の半分の数である個体，すなわち，相同ゲノムを1個しかもたないものである。一般的に，二倍体と比べて細胞が小さく，器官も矮小化し，生育も貧弱でかつ高い不稔性を示すため，そのまま作物として利用することはほとんどない。しかしながら，相同ゲノムを1個しかもたないことから，形質の選抜が容易であり，コルヒチンやオリザリンなどといった有糸分裂阻害剤で処理することにより，染色体倍加を行えば直ちにホモ個体（純系個体）を得ることが可能なため，有用

形質の座乗染色体の同定や核型分析などの遺伝子解析や計画育種を進めるための重要な育種素材となり得る (Bajaj, 1990; Ochatt・Zhang, 1996; Wan ら, 1989; 1991; Wan・Widholm, 1995). 半数体は, 多くの場合, 受精卵の代わりに卵核あるいは精核のみを含む半数性細胞が何らかの機構で単為生殖により胚を形成して発生したものであり, Blakeslee ら (1923) によりシロバナヨウシュチョウセンアサガオ (*Datura stramonium* L.) で初めて発見された. それ以降, タバコ, トマト, トウモロコシ, オオムギ, コムギおよびイネなどの多くの植物で発見された (Humphrey, 1934; Kimber・Riley, 1963; Morinaga・Fukushima, 1934). しかしながら, 自然発生における半数体は, 雌性発生で 0.1%, 雄性発生で 0.01%程度であり, その出現頻度は極めて低いため, 近年では, 半数体を効率的に作出するために, 薬培養, 花粉培養, 遠縁交雑, 未受精胚珠培養および X 線や  $\gamma$  線などの放射線を照射した不活化花粉を利用する偽受精胚珠培養など様々な手法が試みられている (Kurtar ら, 2002; Ochatt・Zhang, 1996; Sato ら, 2000; Sulistyaningsih ら, 2002; Wenzel ら, 1976). これまでにナス科, アブラナ科およびイネ科をはじめとする草本植物を中心に, 40 科 100 属 250 種以上の植物で半数体が確認されている (Bonga ら, 1987; Foroughi-Wehr・Wenzel, 1989; Sangwan-Norreel ら, 1986). さらに, 草本性植物では, 半数体植物を用い, 減数分裂における染色体行動などの細胞遺伝学的解析, 耐寒性や耐乾性, 耐病性などの遺伝解析,  $F_1$  育種による品種育成など多岐にわたって利用されている (Kaneko ら, 2003; Lotfi ら, 2003; Qu・Hancock, 2002; Sulistyaningsih ら, 2002; Tosca ら, 1995; Yan ら, 2000).

一方, 果樹では, モモ, リンゴ, ナシ, ブルーベリー, キウイフ

ルーツおよびバナナなどで半数体が作出されている (Assani ら, 2003; Bouvier ら, 2002; Chalak・Legave, 1996; Dweikat・Lyrene, 1990; Hesse, 1971; Ochatt・Zhang, 1996; Pandey ら, 1990; Zhang・Lespinasse, 1991). また, カンキツ類では, Karasawa (1971) がナツダイダイ (*C. natsudaidai* Hayata) の種子に X 線を照射することにより初めて半数体を育成した. その後, 蒔培養によりカラタチ [*P. trifoliata* (L.) Raf.](Hidaka ら, 1979), シキキツ (*C. madurensis* Lour.) (Chen ら, 1980) およびクレメンティン (*C. clementina* hort. ex Tanaka) (Germana・Chiancone, 2003) の半数体が獲得されている. Oiyama・Kobayashi(1993)は, クレメンティンと‘リー’ [*C. clementina* hort. ex Tanaka×(*C. reticulata* Blanco×*C. paradisi* Macf.)] にナルト (*C. medioglobosa* hort. ex Tanaka) ×四倍体フナドコ (*C. funadoko* hort. ex Tanaka) から得られた三倍体雑種を交配することにより, 雌性配偶子由来の半数体を獲得している. Germana・Chiancone (2001) もまた三倍体グレープフルーツ品種である‘オロブランコ’ (*C. grandis* Osbeck×*C. paradisi* Macf.) をクレメンティンに試験内で交配することにより, クレメンティンの半数体の誘導に成功している. しかしながら, これらの半数体は, 二倍体と比較して, 樹勢が極めて弱く, 初期成育が貧弱であるため, 獲得されてもすぐに枯死するものやほとんど成長しないものが多い. そのため, 果樹の半数体は草本性植物の半数体のように遺伝解析や品種改良に利用されるどころか, 形態や生殖機能などに関する基礎的情報もほとんどない.

最近, Toolapong ら (1996) は, ブンタン品種である‘晩白柚’ (*C. grandis* Osbeck) と‘ルビーレッド’グレープフルーツとの二倍体間交雑から得られた小粒種子を播種し, 三倍体を選抜する過程で半数

体を1個体獲得した。この半数体ブントンは、ロゼット状の形態で、初期成長が貧弱で、これまでに育成された半数体植物と同様な成長を示したが、カラタチ台に高接ぎすると旺盛に成長し、発芽7年目に初めて開花し、それから3年後に結実した。

そこで本研究では、Toolapongら(1996)によって育成された半数体ブントンをを用い、第一に、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、葉、花、花粉および果実の形態を調査した。さらに、半数体ブントン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と染色体観察により葉、花および果実などの様々な器官および組織の倍数性を調査した。第二に、半数体ブントン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い、得られた実生の倍数性と雑種性を解析した。第三に、半数体ブントンの雌性および雄性配偶子における減数分裂過程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。第四に、半数体ブントンの新梢の腋芽へコルヒチン処理を行い、遺伝解析や計画育種などに重要な材料となる倍加半数体の作出を試みた。

## 第 1 章 半数体ブントンの形態的特徴

### 緒言

半数体植物は，一般的に，二倍体と比べて細胞が小さく，器官も矮小化し，生育も貧弱でかつ高い不稔性を示す．果樹においても，リンゴ，ナシおよびモモのバラ科果樹，バナナ，キウイフルーツおよびブルーベリーなどで半数体が獲得されており，それらの形態的特徴として，二倍体と比べ，極めて貧弱な成長を示し，節間が短く，葉が小さく，細長くなることが報告されている（Assaniら，2003；Bouvierら，2002；Chalak・Legave, 1996；Dweikat・Lyrene, 1990；Hesse, 1971；Horfer・Lespinnasse, 1996；Ochatt・Zhang, 1996；Pandeyら，1990；Zhang・Lespinnasse, 1991）．一般的に，永年作物である果樹は，播種から開花結実に至るまで長年月を必要とするが，半数体の成長は極めて貧弱なため，半数体のままで開花に至ることは非常にまれであり，これまでに開花結実が確認されているのはモモのみである（Hesse, 1971；Pooler・Scorza, 1995a）．したがって，果樹の半数体における花，花粉および果実の形態的特徴に関する情報は，草本性植物の半数体と比較して非常に少ない．

カンキツ類の半数体については，Karasawa（1971）がナツダイダイの種子に X 線を照射することにより育成したのが最初である．その後，蒔培養によりカラタチ（Hidakaら，1979），シキキツ（Chenら，1980）およびクレメンティン（Germana・Chiancone, 2003）の半数体が獲得されている．また，Oiyama・Kobayashi（1993）と Germana・Chiancone（2001）はクレメンティンに三倍体を交雑することにより，

雌性配偶子由来の半数体を獲得している。しかしながら、これらの半数体は、二倍体と比較して、樹勢が極めて弱く、初期成育が貧弱で、ほとんど成長しないため、開花結実まで至っていない。

最近、Toolapong ら（1996）は、ブンタン品種である‘晩白柚’と‘ルビーレッド’グレープフルーツとの二倍体間交雑から得られた小粒種子を播種し、三倍体を選抜する過程で半数体を1個体獲得した。また、春崎（1996）は、この半数体ブンタンの発生起源についてアイソザイム分析や Random amplified polymorphic DNA (RAPD) 分析により解析し、雌性配偶子単独に発生したものであることを明らかにした。半数体ブンタンは、ロゼット状の形態で、初期成長が貧弱で、これまで育成された半数体植物と同様な成長を示したが、カラタチ台に高接ぎすると旺盛に成長し（Fig. 1-1a）、発芽7年目に初めて開花し（Figs. 1-1b）、それから3年後に結実した（Figs. 1-1c）。

そこで本章では、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、この半数体ブンタンにおける葉、花、花粉および果実の形態を調査した。さらに、半数体ブンタン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と染色体観察により葉、花および果実などの様々な器官および組織の倍数性を調査した。

## 材料および方法

材料には、九州東海大学農学部果樹園芸学研究室温室栽植の接木5～8年生の Toolapong ら（1996）によって育成された半数体ブンタ



ンと熊本県八代市カンキツ栽培農家春崎清登氏果樹園栽植の約 10 年生の‘晩白柚’を供試した。

形態調査は、葉、花、花粉および果実について行った。すなわち、葉については、葉身長、葉幅、葉身形指数、翼葉長、翼葉幅、葉長/翼葉長、単位面積あたりの葉重および気孔の縦径と横径の 9 項目について調査した。花については、全幅、花弁数、花弁の縦径と横径、雌ずい数、雌ずい長、子房の縦径と横径、胚珠数および雄ずい数の 8 項目について調査した。花粉は、1 葯あたりの花粉数、乾燥花粉の縦径と横径、花粉形指数および花粉稔性の 4 項目について調査した。なお、花粉の微細構造の観察については、開花直前の花蕾から取り出した葯を常法により開葯し、乾燥した花粉をイオンコーター (IB-3, EIKO Engineering Co., Ltd., Tokyo) で金蒸着した後、走査型電子顕微鏡 (ALPHA-30A, ABT Co., Ltd., Tokyo) で観察した。また、花粉稔性は、開花直前の花蕾から取り出した葯を常法により開葯し、乾燥した花粉を 1%アセトカーミンによる染色と寒天培地上での発芽試験により評価した。発芽試験は、10%スクロースおよび 1%寒天を添加した寒天培地を用い、25℃、暗黒条件下で 10 時間培養し、光学顕微鏡を用いて発芽率を調査した。なお、花粉稔性調査は、それぞれ 3 反復行い、1 反復あたり 1000 個以上の花粉を調査した。果実については、果実重、果実の縦径と横径、果形指数、室数、砂じょうの長さ、完全種子と不完全種子数、1 果実あたりの完全種子数および完全種子出現頻度の 11 項目について調査した。なお、葉、花および花粉は 2001 年 5 月に、果実は 2004 年 12 月に調査した。また、半数体ブントンの果実は 1 反復のみであるが、残りはすべて 10 反復ずつ調査した。

半数体ブントンの倍数性が維持されているかを確認するために、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、半数体ブントンの葉、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）の各器官と組織を用いた。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 [ $25\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  propidium iodide (PI), 50mM  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , 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 550 $\mu\text{L}$  chopping buffer と混合し、よく懸濁した。さらに、測定直前に 50 $\mu\text{L}$  の  $500\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  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、半数体ブントン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 $^{\circ}\text{C}$ 、6 時間前処理後、固定液（エタノール：酢酸 = 3 : 1）で 4 $^{\circ}\text{C}$ 、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“オノズカ”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 $^{\circ}\text{C}$ 、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．

### 結果および考察

半数体ブンタンと‘晩白柚’の葉の形態を比較した結果 (Table 1-1)，葉身長と葉幅は‘晩白柚’がそれぞれ143.8mmと82.9mmであったのに対し，半数体ブンタンではそれぞれ108.6mmと54.1mmであり，有意に小さかった．また，葉身長/葉幅より求めた葉身形指数より，半数体ブンタンの葉は‘晩白柚’と比較して，細長くなる傾向が認められた (Fig. 1-2)．単位面積あたりの半数体ブンタンと‘晩白柚’の葉重は，それぞれ22.0mg/cm<sup>2</sup>と34.8 mg/cm<sup>2</sup>であり，‘晩白柚’と比較し，半数体ブンタンの葉は有意に軽く，薄かった．気孔の大きさについても，‘晩白柚’の気孔の縦径と横径がそれぞれ22.2μmと19.6μmであったのに対し，半数体ブンタンのそれらはそれぞれ17.0μmと15.1μmであり，‘晩白柚’と比較して有意に小さかった (Fig. 1-3)．半数体ブンタンと‘晩白柚’の花の形態を比較した結果 (Fig. 1-4, Table 1-2)，完全に開花したときの大きさを表す全幅では，‘晩白柚’が56.9mmであったのに対し，半数体ブンタンでは30.7mmと‘晩白柚’の約1/2程度であった．また，花卉数は，‘晩白柚’で平均4.8枚とほとんどの花が5枚であったのに対し，半数体ブンタンの平均は4.1枚と，4枚の花が多く，花卉が奇形となっているもの

も多く観察された。また、半数体ブントンの花卉と雌ずいは、‘晩白柚’と比較して小さく、雄ずいと胚珠数も‘晩白柚’に比べ少なかった。

一般的に、果樹の半数体は二倍体と比べ極めて貧弱な成長を示し、葉や花が小さくなる傾向がある (Chalak・Legave, 1996; Dweikat・Lyrene, 1990; Horfer・Lespinasse, 1996; Pooler・Scorza, 1995a; Toyama, 1974; Zhang・Lespinasse, 1991)。Oiyama・Kobayashi (1993) は、クレメンティンと‘リー’から得られた半数体の形態を二倍体と比較したところ、半数体の初期成長が非常に遅く、節間が短くなり、葉が細長くなったことを報告している。モモ (Toyama, 1974)、リンゴ (Lespinasse・Godicheau, 1980; Zhang・Lespinasse, 1991) およびキウイフルーツ (Chalak・Legave, 1996) の半数体も二倍体と比較して、節間が短く、葉が細長い特徴を有することが報告されている。また、果樹の半数体植物の開花は非常にまれではあるが、モモで花の形態的特徴について報告されている (Pooler・Scorza, 1995a)。Pooler・Scorza (1995a) は、半数体モモは、二倍体と比較して小さな花をつけ、わずかながらの花粉を形成していたことを報告している。本実験で調査した半数体ブントンも同様の形態を示しており、果樹の半数体は、二倍体と比較して初期成長が遅くなる他、節間が短くなること、葉が細長くなること、花が小さくなること、花粉の生産量が著しく減少することなどの特徴を有することが推測された。

次に、半数体ブントンと‘晩白柚’の花粉の形態を比較した結果 (Table 1-3)、1葯あたりの花粉数は、‘晩白柚’が約 63,000 個であったのに対し、半数体ブントンは約 9,000 個と、著しく少なかった。乾燥花粉の縦径と横径は、‘晩白柚’が 37.3 $\mu\text{m}$  と 26.3 $\mu\text{m}$  であった

のに対し，半数体ブンタンは  $25.4\mu\text{m}$  と  $22.0\mu\text{m}$  であり，‘晩白柚’と比較して有意に小さかった．また，縦径/横径より求められた花粉形指数より，半数体ブンタンの花粉は‘晩白柚’と比較して丸くなる傾向が認められた．乾燥花粉の微細構造を走査型電子顕微鏡で観察した結果 (Fig. 1-5)，‘晩白柚’のそれは発芽溝が明瞭で楕円形のものが多かったが，半数体ブンタンのそれは不稔性花粉と推定される赤血球状のつぶれた形態をしたものが多く観察された．花粉稔性は，‘晩白柚’の染色率および発芽率がそれぞれ  $98.0\%$  と  $88.6\%$  であったのに対し，半数体ブンタンのそれらは  $1.6\%$  と  $0.4\%$  であり，著しく低かったが，わずかながらに稔性花粉が認められた (Fig. 1-6)．アセトカーミンによる染色後の半数体ブンタンと‘晩白柚’の花粉の大きさを比較した結果 (Fig. 1-7)，‘晩白柚’の稔性花粉は  $30\mu\text{m}$  付近に多く分布したのに対し，半数体ブンタンのそれらは  $35\mu\text{m}$  付近に多く分布しており，やや大きかった．

セイヨウアブラナ，モモ，トマトおよびトウガラシなどの半数体では稔性のある花粉が確認されている (Hesse, 1971; Crane ら, 1982; Veilleux, 1985; Pooler・Scorza, 1995a; Yan ら, 2000)．特に，トウガラシの半数体では，アセトカーミン染色による稔性花粉の出現頻度が約  $10\%$  と，比較的高かったことが報告されている (Yan ら, 2000)．また，モモとトウガラシにおいて，半数体と二倍体のアセトカーミンで染色された稔性花粉の大きさがほぼ同じであったことが報告されている (Hesse, 1971; Pooler・Scorza, 1995a; Yan ら, 2000)．半数体ブンタンでは，アセトカーミンで染色された稔性花粉が‘晩白柚’よりやや大きく，花粉稔性が  $1.6\%$  と，トウガラシやモモと比較して低かった．

半数体ブンタンと‘晩白柚’の果実の形態を比較した結果 (Fig. 1-8, Table 1-4), ‘晩白柚’の果実重が約 1,800g であったのに対し, 半数体ブンタンは 200g 程度であり, 非常に小さくなっていた. 室数は, ‘晩白柚’が 15.6 個であったが, 半数体ブンタンでは 9.0 個であり, ‘晩白柚’の約 1/2 程度であった. 砂じょうの大きさを測定した結果, 半数体ブンタンは, ‘晩白柚’より小さくなり, 軽くなっていた (Fig. 1-9). 一方, 種子については, ‘晩白柚’では 1 果実あたりの種子数は 96.8 個であり, 100 粒程度の完全種子を有していたが, 半数体ブンタンの果実では完全種子はおろか不完全種子も確認されず, 全く種子が形成されていなかった.

果樹における半数体の果実特徴に関する報告はモモのみである (Hesse, 1971; Pooler・Scorza, 1995a). Hesse (1971) は, 2 系統のモモの半数体の果実特徴について二倍体と比較して非常に小さかったことを報告している. 一方, Pooler・Scorza (1995a) は, モモの半数体 7 系統を調査し, 7 系統中 5 系統が二倍体と比べ非常に小さい果実を生産したが, 2 系統では大きな果実を生産し, 発芽能力のある種子を形成したことを報告している. 半数体ブンタンの果実では, 起源親である‘晩白柚’と比べ小さく, 種子は全く形成されなかった. 起源親である‘晩白柚’はまれに種子のない果実を生じることから, 半数体ブンタンに着生した果実は単為結果したものと推定される.

次に, 半数体ブンタンの半数性が維持されているかどうかを葉, 花および果実の各器官および組織について, フローサイトメーターで解析した結果 (Fig. 1-10), 半数体ブンタンの葉, がく片, 花卉, 花糸ともに相対蛍光強度が‘晩白柚’と比較して約半分であり, 半

数性を示した。また，果実においても砂じょう，アルベドおよびフラベドともに半数性の相対蛍光強度であった。さらに，半数体ブンタンの様々な位置の枝における幼葉の染色体数を観察した結果 (Fig. 1-1d)，調査したすべての細胞は 9 本の染色体を有していた。これらの結果より，本半数体は半数性を 2004 年まで維持していることが明らかとなった。半数体植物は自然倍加することが報告されている (Wenzel, 1976)。カンキツ類においても，葯培養から多くの二倍体や細胞キメラの植物体が発生している (Chen ら, 1980; Hidaka ら, 1982; Hidaka, 1984; Germana・Chiancone, 2003)。さらに，Yamamoto・Tominaga (2004) は，半数体クレメンティンから半数体と二倍体の細胞キメラの芽条変異が発生したことを報告している。本実験の材料である半数体ブンタンは 2004 年までではあるが，調査したすべての器官，組織で半数性を維持しており，自然倍加を起こしにくい系統ではないかと考えられる。

## 摘要

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，ブンタン品種である‘晩白柚’から得られた半数体ブンタンにおける葉，花，花粉および果実の形態を調査した。また，半数体ブンタン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と染色体観察により葉，花および果実などの様々な器官および組織の倍数性の解析を行った。

半数体ブンタンの葉，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．半数体ブントン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，わずかながらに稔性が認められた．一方，果実は‘晩白柚’と比べ，1/9 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，半数体ブントンの葉，花および果実の各器官，組織をフローサイトメーターで解析した結果，半数体ブントンの葉，がく片，花弁，花糸，砂じょう，アルベドおよびフラベドの相対蛍光強度が‘晩白柚’の半分となり，すべての器官および組織で半数性を示した．さらに，半数体ブントン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本の染色体が確認された．これらの結果より，この半数体ブントン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．



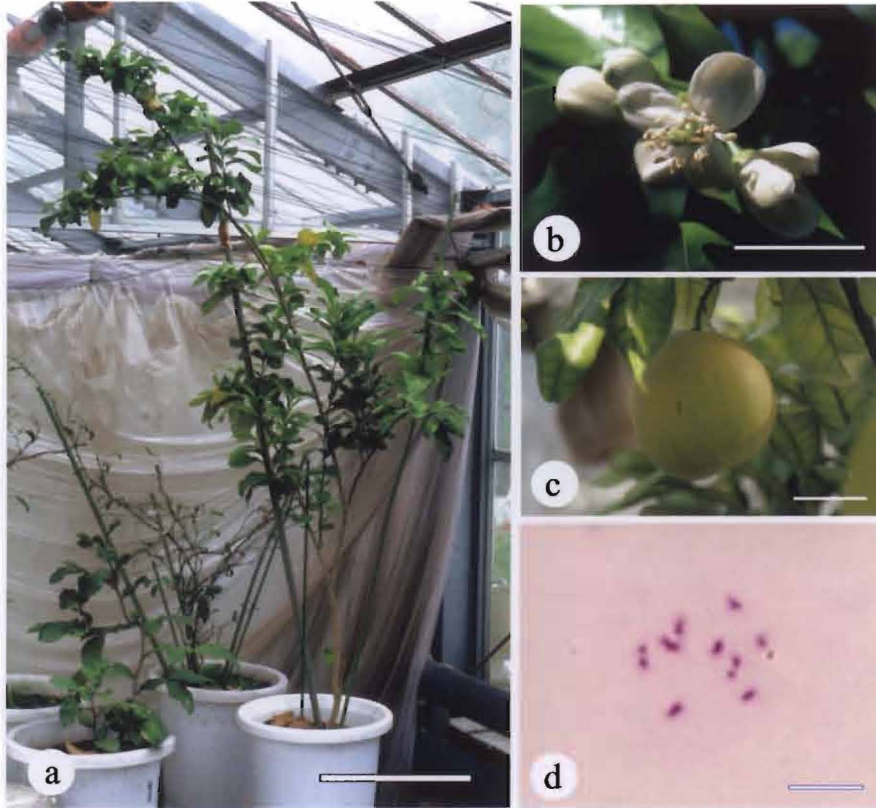


Fig. 1-1. The haploid pummelo from small seed-derived seedlings in the cross between 'Banpeiyu' pummelo and 'Ruby Red' grapefruit.  
a : Seven year-old haploid tree. Bar=30 cm.  
b : Flowers of the haploid. Bar=3 cm.  
c : Fruit of the haploid. Bar=5 cm.  
d : Somatic chromosomes of a young leaf cell ( $2n=X=9$ ). Bar=10  $\mu$ m.



Fig. 1-2 Morphological characteristics of leaves in the haploid pummelo and 'Banpeiyu' pummelo. Bar=5 cm.

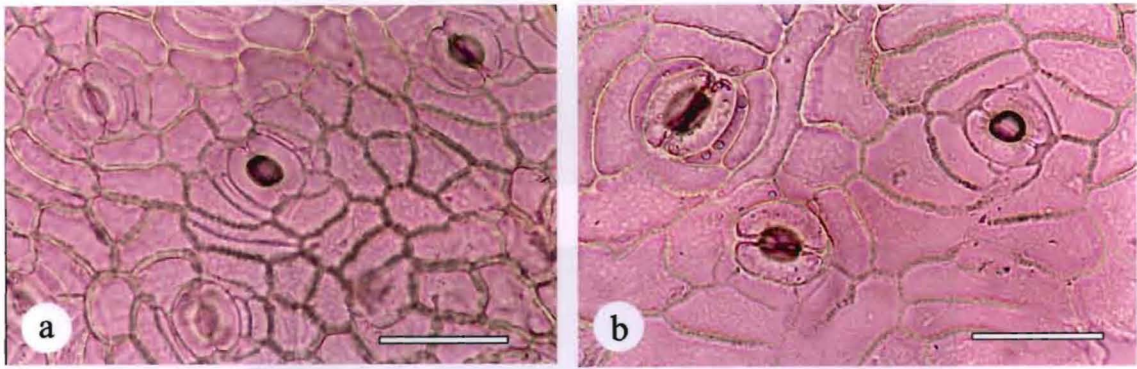


Fig. 1-3. Morphological characteristics of stomata in the haploid pummelo (a) and 'Banpeiyu' pummelo (b). Bars=50  $\mu$ m.

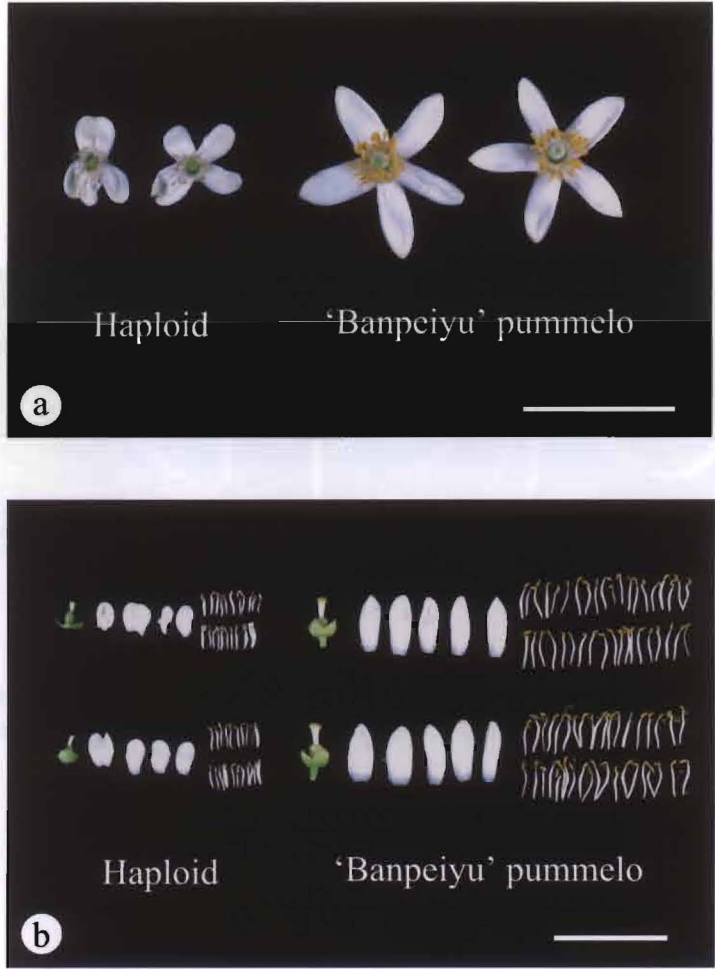


Fig. 1-4. Morphological characteristics of flowers in the haploid pummelo and 'Banpeiyu' pummelo. Bars=5 cm.  
 a : Whole flower. b : Pistil, petal, and stamen.

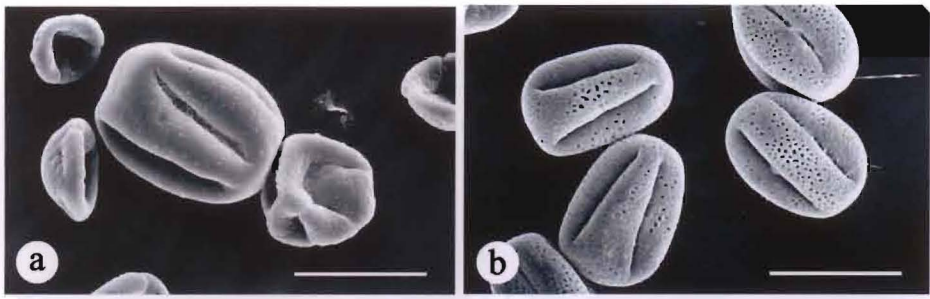


Fig. 1-5. Scanning electron micrographs of pollen grains in the haploid pummelo (a) and 'Banpeiyu' pummelo (b). Bars=30  $\mu\text{m}$ .

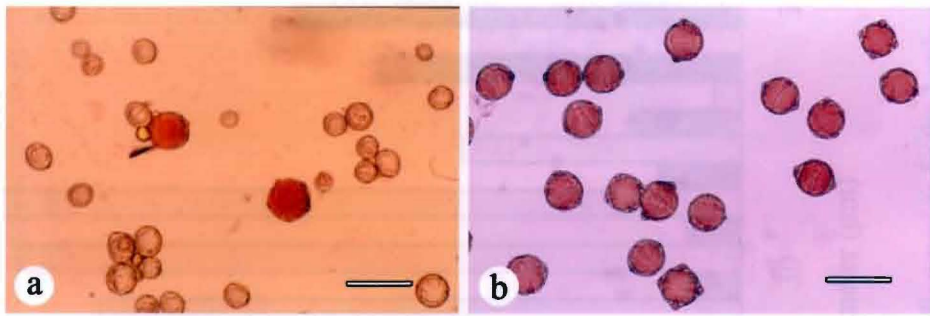


Fig. 1-6. Pollen grains stained by 1% acetocarmine in the haploid pummelo (a) and 'Banpeiyu' pummelo (b). Bars=50  $\mu$ m.

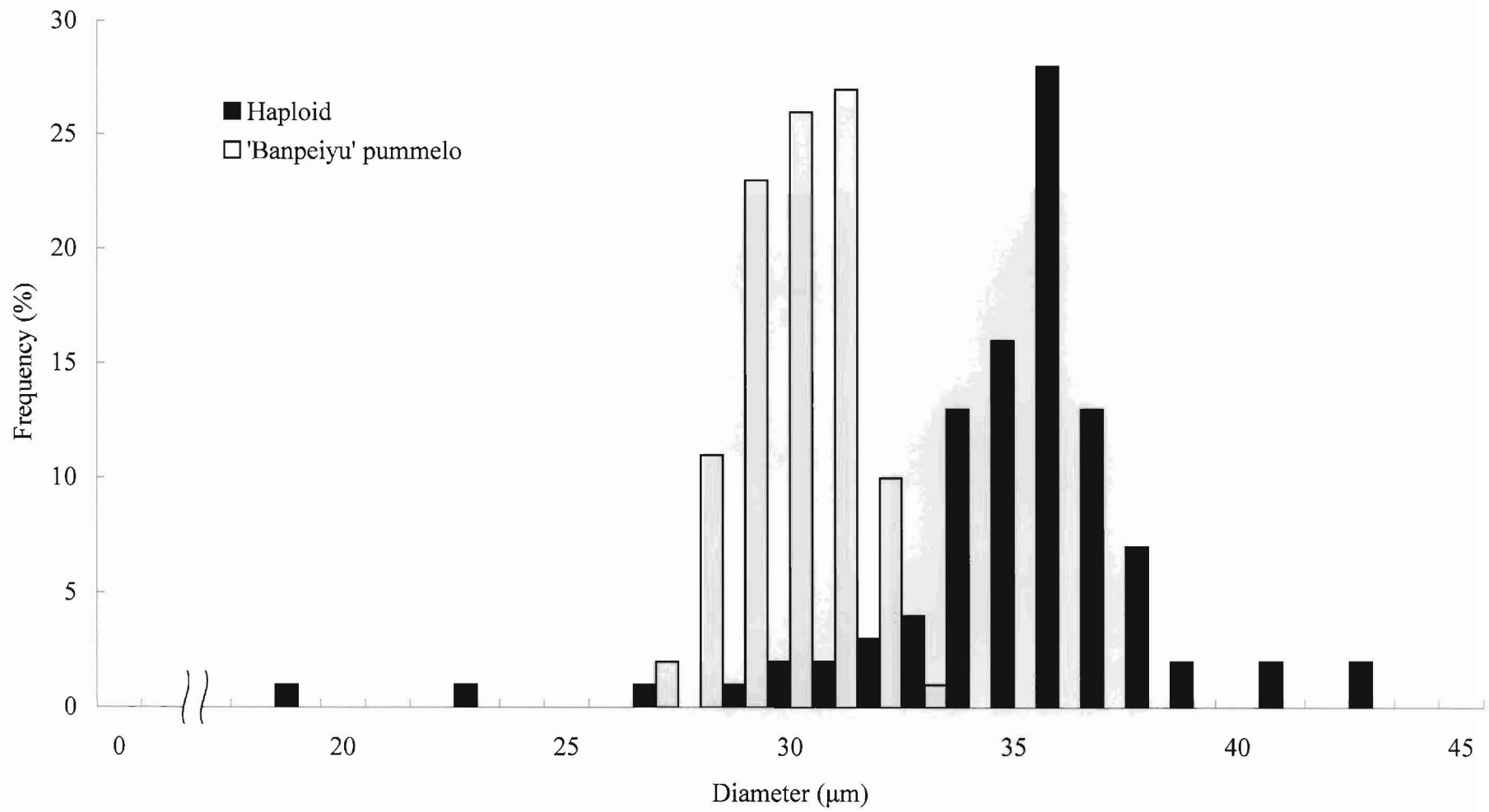


Fig. 1-7. Comparison of the diameter of the fertile pollen grains in the haploid pummelo and 'Banpeiyu' pummelo.

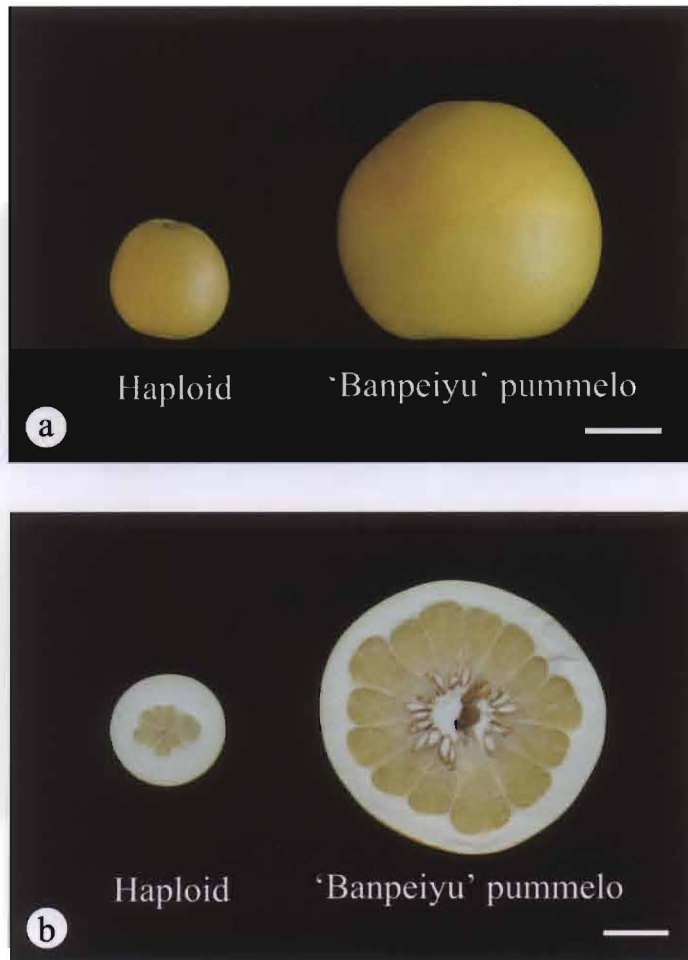


Fig. 1-8. Morphological characteristics of fruits in the haploid pummelo and 'Banpeiyu' pummelo. Bars=5 cm.  
a : Whole fruit. b : Cross section.



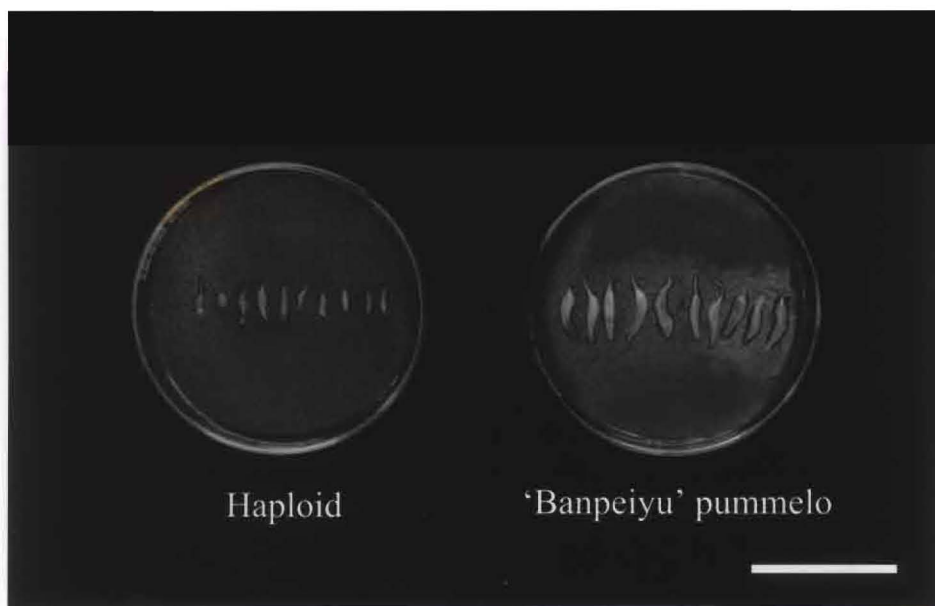


Fig. 1-9. Morphological characteristics of juice sac in the haploid pummelo and 'Banpeiyu' pummelo. Bar=5 cm.

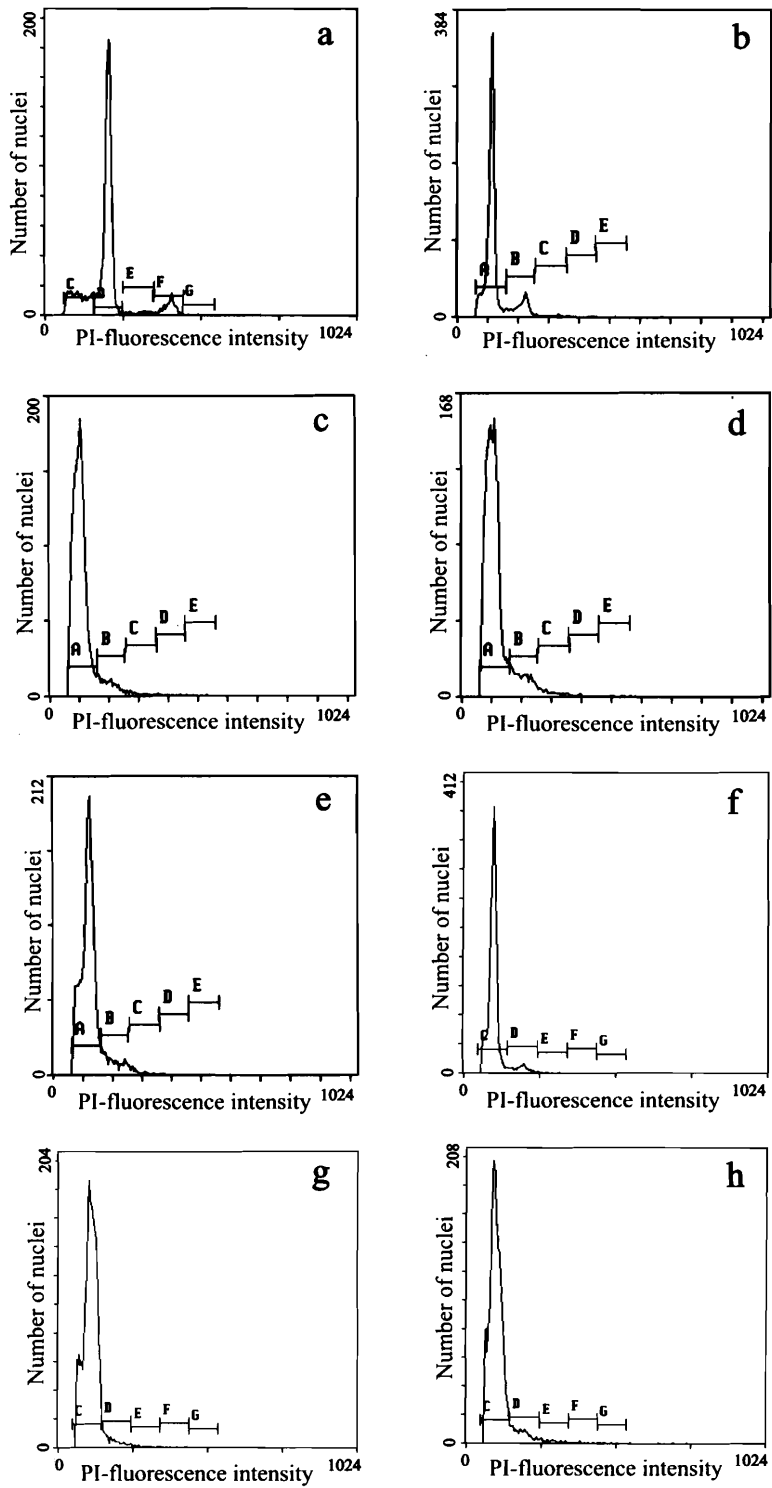


Fig. 1-10. Flow cytometry analysis of a leaf, flower, and fruit in the haploid pummelo. a : Leaf of 'Banpeiyu' pummelo (control), b : Leaf, c : Sepal, d : Petal, e : Filament, f : Juice sac, g : Albedo, h : Flavedo.

Table 1-1. Comparison of the morphological characteristics of leaves in the haploid pummelo and 'Banpeiyu' pummelo.

Strains	Leaf blade (mm)		Shape index of leaf blade <sup>y</sup>	Wing leaf (mm)		Shape index of wing leaf <sup>w</sup>	Leaf weight (mg/cm <sup>2</sup> )	Stomata (μm)	
	Length	Width		Length	Width			Length	Width
Haploid	108.6b <sup>z</sup>	54.1b	2.0a	24.6b	16.1NS <sup>x</sup>	1.7NS	22.0b	17.0b	15.1b
'Banpeiyu' pummelo	143.8a	82.9a	1.7b	31.2a	22.1	1.5	34.8a	22.2a	19.6a

<sup>z</sup> Different letters represent significant differences in Tukey's multiple range test, 1% level.

<sup>y</sup> Length of leaf blade / Width of leaf blade.

<sup>x</sup> Non-significance.

<sup>w</sup> Length of wing leaf / Width of wing leaf.

Table 1-2. Comparison of the morphological characteristics of flowers in the haploid pummelo and 'Banpeiyu' pummelo.

Strains	Diameter (mm)	No. of petal	Petal (mm)		No. of pistil	Length of pistil (mm)	Ovary (mm)		No. of ovule	No. of stamen
			Length	Width			Length	Width		
Haploid	30.7b <sup>z</sup>	4.1b	17.3b	10.9b	1.0NS <sup>y</sup>	11.0b	4.2b	4.0b	66.8b	29.0b
'Banpeiyu' pummelo	56.9a	4.8a	36.3a	24.3a	1.0	20.6a	8.6a	9.5a	213.0a	43.1a

<sup>z</sup>Different letters represent significant differences in Tukey's multiple range test, 1% level.

<sup>y</sup>Non-significance.

Table 1-3. Comparison of the morphological characteristics of the pollen grains in the haploid pummelo and 'Banpeiyu' pummelo.

Strains	No. of pollen grain per anther	Pollen grain ( $\mu\text{m}$ )		Shape index of pollen grain <sup>y</sup>	Pollen fertility (%)	
		Length	Width		Stainability	<i>In vitro</i> germination
Haploid	8825 b <sup>z</sup>	25.4b	22.0b	1.2b	1.6b	0.4b
'Banpeiyu' pummelo	63097 a	37.3a	26.3a	1.4a	98.0a	88.6a

<sup>z</sup>Different letters represent significant differences in Tukey's multiple range test, 1% level.

<sup>y</sup>Length of pollen grain / Width of pollen grain.

Table 1-4. Comparison of the morphological characteristics of fruits in the haploid pummelo and 'Banpeiyu' pummelo.

Strains	Av. fruit wt. (g)	Fruit (mm)		Shape index of fruit <sup>z</sup>	No. of locule	Juice sac		No. of seed		No. of developed seeds per fruit <sup>y</sup>	% of developed seeds
		Length	Width			Length (mm)	Weight (mg)	Developed	Undeveloped		
Haploid	201.0	86.1	86.1	1.00	9.0	9.7	18.9	0	0	—	—
'Banpeiyu' pummelo	1834.5	206.6	165.0	1.25	15.8	16.5	76.5	968	30	96.8	97.0

<sup>z</sup> Length of fruit / Width of fruit.

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

### 緒言

半数体植物の中には、半数性を維持した状態で開花し、正常に機能する花粉と卵細胞を発生し、最終的には完全な種子を形成する系統も存在する。草本性植物では、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において稔性のある配偶子の形成が確認されている (Veilleux, 1985; Yan ら, 2000; Zagorcheva ら, 1987)。特に、トウガラシの半数体では、稔性花粉の出現頻度が約 10%であったことが Yan ら (2000) によって報告されている。さらに、雌性配偶子にも稔性があり、発芽能力のある種子が得られ、二倍体の雑種後代が獲得されている。

果樹では、半数性を維持したまま開花結実した例は非常に少ないが、モモのいくつかの半数体系統で生殖機能が評価されている (Hesse, 1971; Pooler・Scorza, 1995a; Toyama, 1974)。Hesse (1971) はモモの半数体の生殖機能を調査したところ、いずれのモモの半数体も高い不稔性を示したが、いくつかの花粉が正常に発芽し、その花粉を二倍体に交配を行ったところ、着果が認められたことを報告した。また、Pooler・Scorza (1995a) は 2 系統の半数体のモモが放任授粉で正常な種子を形成したことを報告した。このように、モモの半数体ではわずかではあるが、雌性および雄性配偶子に稔性があることが確認されている。

一方、Toolapong ら (1996) によって育成された半数体ブンタンは、第 1 章においてその花器の形態について調査した結果、多くの

奇形が観察された。また，半数体ブンタンの花粉における染色率と発芽率を調査した結果，それぞれ 1.6%と 0.4%と極めて低いものの，わずかながらに稔性花粉を形成している可能性が認められた。

そこで本章では，この半数体ブンタン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，半数体ブンタンと種々の二倍体カンキツ品種との交雑を行った。さらに，RAPD 分析およびクロモマイシン A<sub>3</sub> (CMA) 染色法により，これらの交雑から得られた実生の雑種性を解析した。

#### 材料および方法

供試材料には，半数体ブンタン，‘晩白柚’，‘清見’タンゴール（‘宮川早生’ウンシュウミカン×‘トロビタ’スイートオレンジ），‘南風’（‘清見’タンゴール×‘フェアチャイルド’），‘宮内’イヨカン（*C. iyo hort. ex Tanaka*），‘土佐文旦’（*Citrus grandis* Osbeck），‘木頭’ユズ（*C. junos hort. ex Tanaka*），‘川野’ナツダイダイおよびヒュウガナツ（*C. tamurana hort. ex Tanaka*）の成木を用い，半数体ブンタンの自家受粉，半数体ブンタンと二倍体カンキツ品種および二倍体カンキツ品種と半数体ブンタンの交雑を行った（Table 2-1）。

交雑は，5 月中旬の開花直前の花を除雄し，綿棒で受粉した後，袋をかけた。交雑した果実は，11 月下旬に収穫し，果実重と種子数を調査した。その後，種子に番号をつけ，それぞれについて種子重を測定した。さらに，二倍体品種と半数体ブンタンの交雑から得られたすべての完全種子は，種皮を取り除き，25℃のインキュベータ



一内で湿った濾紙上に置床し、発芽させた。また、不完全種子は、3.0%スクロース、 $0.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  麦芽抽出物および  $2.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  ジェランガムを添加した Murashige and Tucker (MT, Murashige・Tucker, 1969) 培地に置床し培養した。培養はいずれも  $25^{\circ}\text{C}$ 、 $40\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ 、連続照明条件下で行った。

半数体ブンタンと二倍体カンキツ品種との交雑から得られた実生の倍数性解析は、第1章と同様にフローサイトメーターによる方法と酵素解離による染色体観察法を適用した。

さらに、‘清見’と半数体ブンタンの交雑から得られた実生1個体の雑種性を解析するために、RAPD分析とCMA染色による染色体構成の調査を行った。RAPD分析は、‘清見’と半数体ブンタンの交雑から得られた実生とその両親の幼葉を採取し、それぞれの幼葉200mgから、全DNAをCTAB法(Doyle・Doyle, 1987)により抽出した。プライマーには、10merのランダムプライマー(Operon Technology Inc., CA, USA)4種類(OPA-7, OPA-11, OPA-12, OPB-18)を使用した。Polymerase chain reaction (PCR)の反応液(25 $\mu\text{L}$ )の組成は、10mM Tris-HCl (pH 8.0)、80mM KCl、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、100 $\mu\text{M}$  dNTPs、0.3 $\mu\text{M}$  プライマー、2.5U Tth Taq DNA polymerase および 10ng DNAとした。DNAの増幅には、ASTECC Program Control System PC-700 (ASTECC Co., Ltd., Fukuoka)を使用し、前処理  $94^{\circ}\text{C}\cdot 30$  秒間、熱変性  $94^{\circ}\text{C}\cdot 30$  秒間、アニーリング  $37^{\circ}\text{C}\cdot 2$  分間、伸長反応  $72^{\circ}\text{C}\cdot 3$  分間で35サイクルとした。それぞれのサンプルは、 $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Ethidium bromideを含む1.5%アガロースゲルで電気泳動後、紫外線照射下でバンドパターンを観察した。

CMA染色による染色体構成の調査は、第1章と同様に酵素解離法

により‘清見’と半数体ブンタンの交雑から得られた実生とその両親のプレパラートを作成後、ギムザ液で染色した。光学顕微鏡で染色体の位置を確認した後、70%エタノールで脱色した。一部改良を加えた Befu ら（2000）の方法に従い、 $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  CMA で染色体を染色し、落射蛍光顕微鏡（BX51; Olympus Co., Tokyo）を用いて BV 励起で観察した。CMA 染色された染色体は、Befu ら（2000）と Yamamoto・Tominaga（2003）の分類に従い、蛍光の強い CMA（+）領域の数と位置によって識別した（Fig. 2-1）。すなわち、染色体の両端と動原体付近に CMA（+）領域を有するものを A 型、染色体の一方の腕の端部と他方の腕の動原体付近に CMA（+）領域を有するものを B 型、染色体の両端に CMA（+）領域を有するものを C 型、染色体の一方の端部に CMA（+）領域を有するものを D 型、染色体に CMA（+）領域がないものを E 型および染色体の動原体付近に CMA（+）領域を有するものを F 型とした。

### 結果および考察

半数体ブンタンの雌性および雄性配偶子の生殖機能を評価するために、半数体ブンタンと種々の二倍体カンキツ品種間で交雑を行った（Table 2-1）。半数体ブンタンを種子親とした場合、すべての交雑組合せにおいて全く着果が認められなかった。一方、種々の二倍体カンキツ品種に半数体ブンタンの花粉を交雑した時、すべての組合せ、すなわち、‘晩白柚’、‘清見’、‘南風’、‘宮内’イヨカンおよび‘土佐文旦’で着果が認められた。さらに、‘清見’、‘南風’、‘宮内’

イヨカンおよび‘土佐文旦’からは多くの完全種子といくつかの不  
完全種子が得られた (Fig. 2-2). 完全種子出現率は放任受粉区と比  
較してそれほど差異は認められなかったが, ‘清見’, ‘南風’, ‘宮内’  
イヨカンおよび‘土佐文旦’の1果実あたりの完全種子数は, それ  
ぞれ 4.7, 5.1, 0.2 および 15.0 個であった. なお, ‘晩白柚’ と半数  
体ブンタンの交雑では, 着果が認められたものの, その果実からは  
全く種子は得られなかった.

半数体ブンタンを種子親とした場合, 着果が全く認められなかつ  
た. 有葉花を用いたのにもかかわらず, 交雑2週間後にはすべての  
交雑果が落下した. この理由としては, おそらく半数体ブンタンの  
胚のうと二倍体品種の花粉の間で正常な受精が行われていないもの  
と思われる.

次に, ‘晩白柚’ を種子親として半数体ブンタンの花粉を授粉した  
ところ, 種子を獲得することができなかった. これまでに ‘晩白柚’  
は非常に強い自家不和合性を有することが知られている (磯部ら,  
1982; 岩政, 1976). 磯部ら (1982) は ‘晩白柚’ の自家受粉から得  
られた果実が ‘川野夏橙’ のような二倍体カンキツ品種を交配して  
得られた果実より小さく, これらの果実からはほとんど種子が得ら  
れなかったことを報告した. 本実験では, ‘晩白柚’ の自家受粉から  
得られた果実はその放任受粉したものと比較して有意に小さく, 種  
子が全く形成されていなかった. また, ‘晩白柚’ と半数体ブンタン  
の交雑から得られた果実は, ‘晩白柚’ の自家受粉したものと同様の  
結果を示した. これらの結果より, 半数体ブンタンと ‘晩白柚’ の  
間に自家不和合性が発現している可能性が示唆された.

二倍体カンキツ品種と半数体ブンタンとの交雑から得られた完全

種子と不完全種子をそれぞれ湿ったろ紙上と MT 培地上に播種した結果、不完全種子は全く発芽しなかったが、完全種子は正常に発芽し、‘清見’、‘南風’、‘宮内’イヨカンおよび‘土佐文旦’の完全種子からはそれぞれ 14, 45, 1 および 13 本の実生が得られた。これらの実生を土壌に移植すると、旺盛に成長し (Fig. 2-3a), すべての実生において半数体ブンタンに特異的な形態である大きな翼葉が確認された (Fig. 2-3b)。得られた実生すべてについてフローサイトメーターと染色体観察により倍数性を解析した結果 (Fig. 2-4, Table 2-2), そのほとんどが二倍体であったが、‘南風’の交雑から 1 個体の三倍体を得られた。なお、異数体の出現についてはすべての組合せで認められなかった。

次に、‘清見’と半数体ブンタンの交雑から得られた実生 1 個体について雑種性を解析するために、RAPD 分析と CMA 染色による染色体構成の調査を行った。RAPD 分析を行った結果 (Fig. 2-5), 得られた実生のバンドパターンはその両親の特異的なバンドをそれぞれ有していた。さらに、CMA 染色により得られた実生とその交雑親である‘清見’と半数体ブンタンについて染色体構成を調査した結果、‘清見’の染色体構成は  $1B+2C+7D+8E$  であったのに対し (Fig. 2-6a), 半数体ブンタンは  $1A+1B+1C+2D+4E$  であった (Fig. 2-6b)。一方、得られた実生は  $1A+1B+3C+5D+8E$  の染色体で構成されており (Fig. 2-6c), 半数体ブンタンの特異的な染色体である A 型が確認された。このように、RAPD 分析と CMA 染色による染色体構成により、‘清見’と半数体ブンタンの交雑から得られた実生が雑種であることが確認された。これらの結果から、半数体ブンタンでは稔性花粉 ( $n=9$ ) が形成されていることが明らかとなった。

カンキツでは，二倍体間の交雑から得られる小粒種子から三倍体が高い頻度で出現することが報告されている (Esen・Soost, 1971; Toolapong ら, 1996; Wakana ら, 1981). 本実験では，‘南風’ と半数体ブンタンの交雑から 1 個体の三倍体を得ることができた. この三倍体は，おそらく‘南風’ の非還元性の雌性配偶子 ( $2n$ ) と 9 本の染色体を持つ半数体ブンタンの雄性配偶子との受精によって出現したものと推測される. しかしながら，‘南風’ と半数体ブンタンの交雑から得られた完全種子の平均種子重は 0.24g であり，三倍体の種子重は 0.27g の普通種子由来であった. 第 1 章において半数体ブンタンの染色花粉の大きさを測定した結果，極めて低頻度 (染色花粉の約 4%) であるが，染色花粉 (約  $35\mu\text{m}$ ) の中でも  $40\mu\text{m}$  以上の非常に大きい花粉の出現が認められた. このことから，この三倍体は‘南風’ の還元雌性配偶子 ( $n$ ) と染色体が倍加した半数体ブンタンの雄性配偶子 ( $2n$ ) との受精によって発生した可能性も考えられる. 今後，この三倍体の発生起源について詳細な細胞遺伝学的解析が必要であると考えられる.

半数体植物における稔性のある配偶子形成についてはセイヨウアブラナ，モモ，トマトおよびトウガラシなどのいくつかの種で報告されている (Hesse, 1971; Pooler・Scorza, 1995a; Toyama, 1974; Veilleux, 1985; Yan ら, 2000). Pooler・Scorza (1995a) は，モモの半数体における稔性回復のメカニズムに関して，第一減数分裂においてすべての染色体が同一極に移動した場合，稔性のある配偶子が形成されることを記している. それに対し，Hesse (1971) は第二減数分裂における紡錘糸の形成方向の平行によるものと提唱している. 一方，Yan ら (2000) は，トウガラシの半数体において，第一

減数分裂の分裂細胞の遅延が第一分裂復旧（first division restitution, FDR）を引き起こし、それによって、半数体の稔性が回復したことを発見した。半数体ブンタンにおいても、そのような現象が起こっているものと推察される。

近年、酵素解離と CMA や 4'-6-diamidino-2-phenyl-indole (DAPI) のような蛍光染色の組合せによる染色体マッピング技術が、カンキツ染色体の同定に利用され、ゲノム解析や細胞融合、倍数性育種などの生物工学的研究に応用されている (Befu ら, 2000; Guerra, 1993; Miranda ら, 1997a, b; Pedrosa ら, 2000; Yamamoto・Tominaga, 2003; 楊ら, 2002)。本実験では、CMA 染色により A 型染色体は半数体ブンタンの特異的なマーカーとして区別することができ、‘清見’ と半数体ブンタンから得られた実生の雑種性を確認することができた (Fig. 2-6)。さらに、マーカーとなる染色体の遺伝もまた後代で確認することができた。よって、CMA 染色は A 型染色体のような種特異的なマーカーを利用することにより、雑種解析に有効な方法になると考えられる。

以上より、種々の二倍体カンキツ品種と半数体ブンタンの交雑から‘晩白柚’の形態的特徴である翼葉を有する多くの二倍体が得られた。さらに、‘清見’ と半数体ブンタンとの交雑から得られた 1 個体の実生は、RAPD 分析および CMA 染色による染色体構成の解析により雑種であることが確認された。これらの結果から、半数体ブンタンでは稔性花粉 ( $n=9$ ) が形成されていることが明らかとなった。

## 摘要

ブンタン品種である‘晩白柚’の実生から得られた半数体ブンタン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、半数体ブンタンと種々の二倍体カンキツ品種との交雑を行った。半数体ブンタン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、半数体ブンタン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、半数体ブンタン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’と半数体ブンタン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、半数体ブンタン由来と考えられるA型染色体がその実生で認められ、雑種であることが確認された。これらの結果から、半数体ブンタンでは稔性花粉 ( $n=9$ ) が形成されていることが明らかとなった。

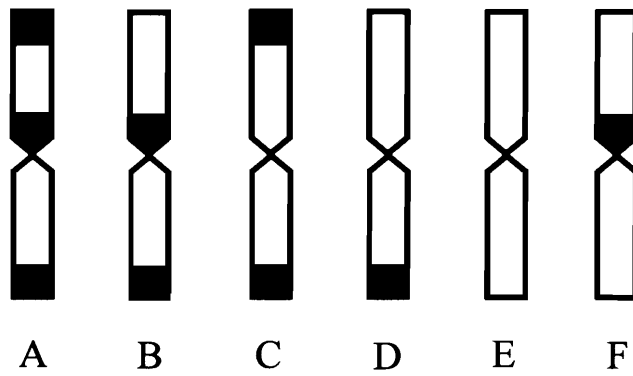


Fig. 2-1. Idiograms of somatic chromosome types in citrus according to the position of CMA positive bands. The black regions shown in the idiograms indicate CMA positive bands.

- A : Telomeric band in both arms and proximal band in one arm.
- B : Telomeric band in one arm and proximal band in the other arm.
- C : Telomeric band in both arms.
- D : Telomeric band in one arm.
- E : No band.
- F : Proximal band in one arm.



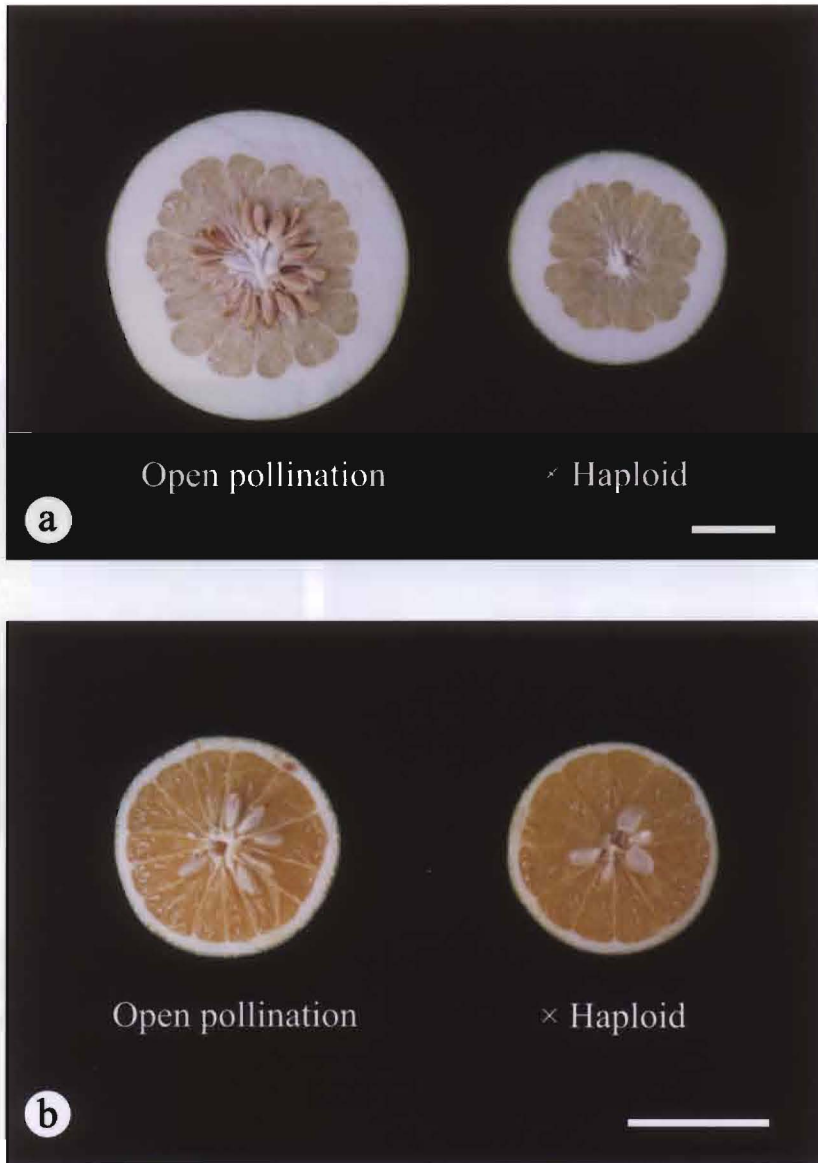


Fig. 2-2. The fruits obtained from the crosses between diploid citrus cultivars and the haploid pummelo. Bars=5 cm. a : 'Banpeiyu' pummelo. b : 'Kiyomi' tangor.

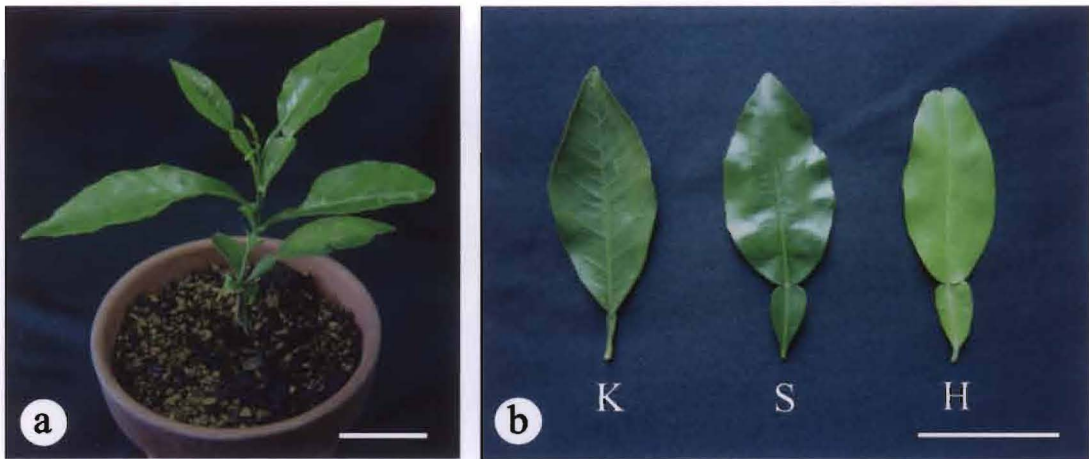


Fig. 2-3. The seedling obtained from the cross between 'Kiyomi' tangor and the haploid pummelo(a) and the comparison of its morphology of leaves with the parents (b). Bars=5 cm.  
K : 'Kiyomi' tangor. S : Seedling. H : The haploid.

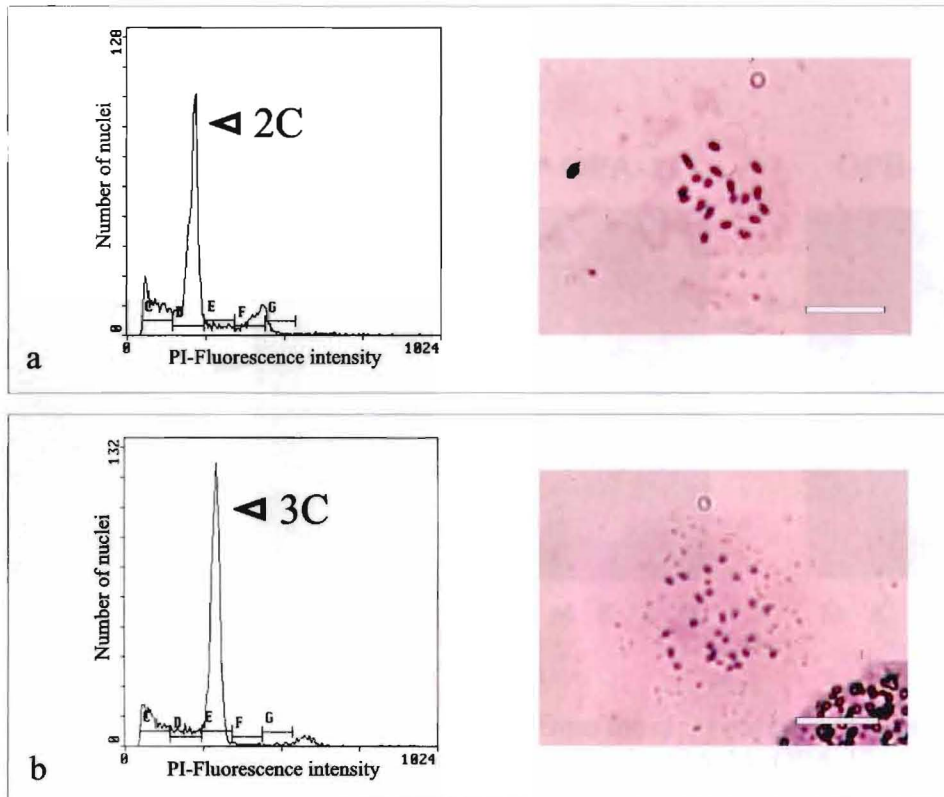


Fig. 2-4. Flow cytometric analysis and chromosome observation of seedlings obtained from the cross between 'Nanpu' tangor and the haploid pummelo. Bars=10  $\mu$ m. a : Diploid ( $2n=2X=18$ ). b : Triploid ( $2n=3X=27$ ).

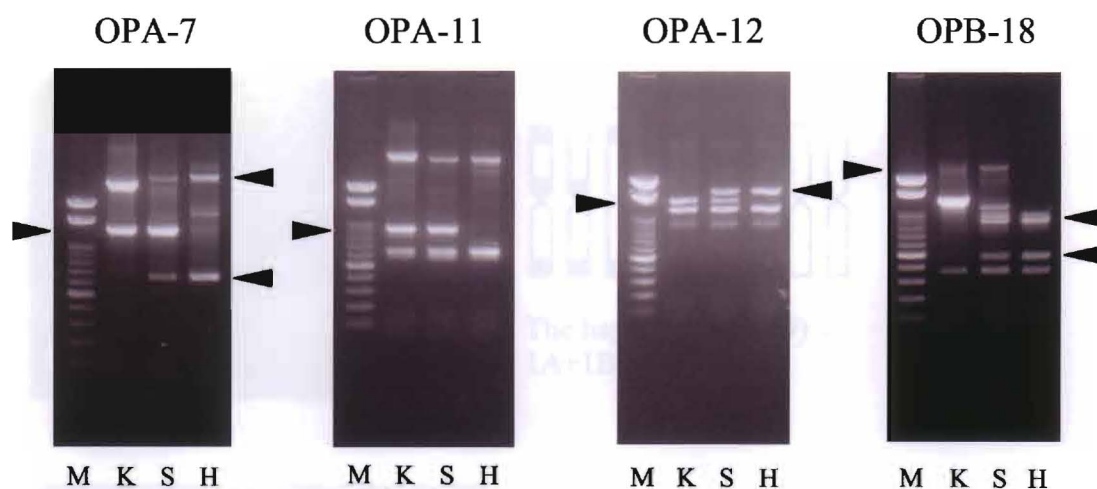
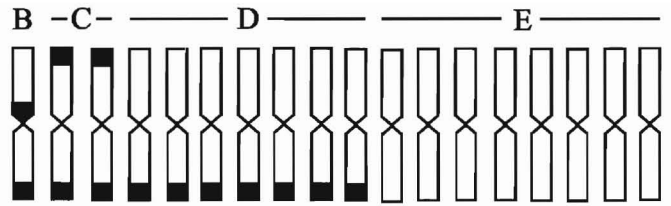
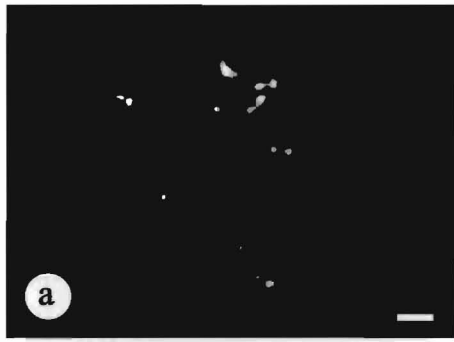
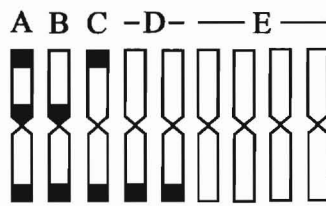
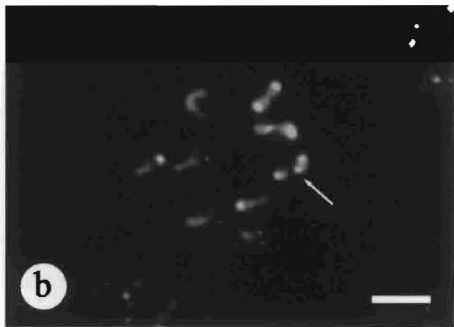


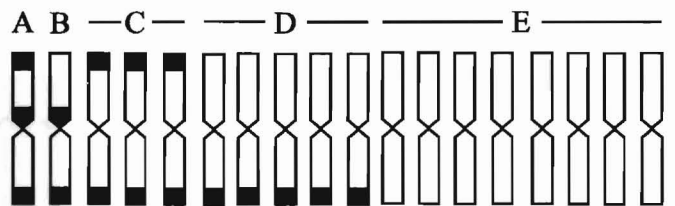
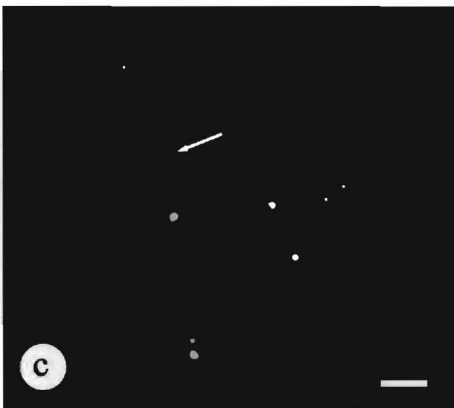
Fig. 2-5. RAPD analysis of the seedling obtained from the cross between 'Kiyomi' tangor and the haploid pummelo. Four primers (OPA-7, OPA-11, OPA-12, and OPB-18) were used for the analysis. Arrows indicate the bands specific to each parent. M : 100 bp ladder marker. K : 'Kiyomi' tangor. S : Seedling. H : The haploid.



'Kiyomi' tangor ( $2n=2X=18$ )  
 $1B+2C+7D+8E$



The haploid ( $2n=X=9$ )  
 $1A+1B+1C+2D+4E$



Seedling ( $2n=2X=18$ )  
 $1A+1B+3C+5D+8E$

Fig. 2-6. Photographs and idiograms of CMA banding patterns in the somatic chromosomes of 'Kiyomi' tangor (a), the haploid pummelo (b) and the seedling obtained from the cross between 'Kiyomi' tangor and the haploid (c). Bars=5  $\mu$ m. The black regions shown in the idiograms indicate CMA positive bands. Arrows indicate type A chromosome. A: Telomeric band in both arms and proximal band in one arm.

Table 2-1. Fruit sets and seed contents in the crosses between the haploid pummelo and several diploid citrus cultivars.

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>z</sup>
Seed parent	Pollen parent					Developed	Undeveloped		
Haploid	Open pollination	—	0	—	—	—	—	—	—
	Haploid	10	0	0	—	—	—	—	—
	‘Banpeiyu’	10	0	0	—	—	—	—	—
	‘Kito-Yuzu’	10	0	0	—	—	—	—	—
	‘Kawano-Natudaikai’	10	0	0	—	—	—	—	—
	Hyuganatsu	10	0	0	—	—	—	—	—
‘Banpeiyu’	Open pollination	—	3	—	1484.0 a <sup>y</sup>	279	15	9 3.0	94.9
	Haploid	14	5	35.7	807.4 b	0	0	0	0
	‘Banpeiyu’	5	4	80.0	905.0 b	0	0	0	0
‘Kiyomi’	Open pollination	—	5	—	275.2	68	3	1 3.6	95.8
	Haploid	5	3	60.0	212.3	14	0	4.7	100
‘Nanpu’	Open pollination	—	5	—	272.4	26	5	5.2	83.9
	Haploid	33	10	30.3	280.3	51	18	5.1	73.9
‘Miyauchi-Iyokan’	Open pollination	—	3	—	496.3	26	8	8.7	76.5
	Haploid	11	6	54.5	340.0	1	0	0.2	100
‘Tosa-Buntan’	Open pollination	—	3	—	593.7	140	17	4 6.7	89.2
	Haploid	10	1	10.0	388.0	15	2	1 5.0	88.2

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

<sup>y</sup>Different letters represent significant differences in Tukey's multiple range test, 1% level.

Table 2-2. Ploidy level of seedlings obtained from the crosses between four diploid citrus cultivars and the haploid pummelo.

Seed parent	No. of seeds examined	No. of germinated seeds	% of germination	No. of seedlings examined	Ploidy level		
					2X	3X	Other
'Kiyomi'	14	11	78.6	11	11	0	0
'Nanpu'	51	45	88.2	45	44	1	0
'Miyauchi-Iyokan'	1	1	100	1	1	0	0
'Tosa-Buntan'	15	13	86.7	13	13	0	0

### 第 3 章 半数体ブントンの配偶子形成の異常

#### 緒言

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会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（Crane ら，1982；Hesse, 1971；Veilleux, 1985；Yan ら，2000；Zagorcheva ら，1987）．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半数体ブントンは，第 1 章において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，第 2 章において種々の二倍体カンキツ品種との交雑を行ったところ，稔性花粉（ $n=9$ ）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明らかでない．



そこで本章では，半数体ブンタン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．

### 材料および方法

材料には，第 1 章と同様に接木約 10 年生の半数体ブンタンと約 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）の方法に従って行った．すなわち，開花前 14 日から開花後 2 日までの半数体ブンタンと‘晩白柚’の花蕾と花を経時的に採取し，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，葯中から種々の発育ステージにある小胞子をスライドグラス上に取り出し，核染色を行った後，落射蛍光顕微鏡を用いて UV 励起で花粉母細胞の減数分裂過程を観察した．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  $1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  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，第 1 章と同様に 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．

次に，半数体ブンタンの雌ずい内における花粉管伸長を調査するため，ハッサクを交配した半数体ブンタンの花を交配後 1 日から 8 日まで採取し，FAA で固定した．固定した花を 1N NaOH に 1 時間

浸漬し，水洗後，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 KPO<sub>3</sub> に 5℃で一昼夜浸漬・染色し，落射蛍光顕微鏡を用いて UV 励起で観察を行った．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，開花前 14 日から開花後 2 日までの半数体ブンタンと‘晩白柚’の花蕾と花を経時的に採取し，FAA で固定した．固定後，それぞれの花卉と雄ずいを取り除き，子房を常法に従いエタノールと 3-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 15μm 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．

### 結果および考察

半数体ブンタンと‘晩白柚’における花粉母細胞の減数分裂過程を観察した結果 (Figs. 3-1, 3-2)，‘晩白柚’は正常な減数分裂を行っていた．すなわち，第一減数分裂において核内に広がっていた染色質は凝縮を開始し (Fig. 3-1a)，相同染色体を形成した．それらの相同染色体は対合し，赤道面に 9 本の二価染色体が観察された (Fig. 3-1b)．これらの二価染色体は対合面で分離し，相同染色体はそれぞれ両極に移動した (Figs. 3-1c, d)．第二減数分裂に移り，それぞれの染色体は赤道面に並列し (Fig. 3-1e)，染色分体は両極に分配され

た (Figs. 3-1f, g). その結果, 四分子期において小胞子の大きさが均一の四分子が形成された (Fig. 3-1h). それに対し, 半数体ブントンの花粉母細胞の減数分裂過程は, ‘晩白柚’と同様に第一減数分裂と第二減数分裂を行っていたものの, ‘晩白柚’と明らかに染色体行動が異なっていた (Fig. 3-2). すなわち, 第一分裂中期において赤道面に 9 本の一価染色体が出現し (Figs. 3-2a, b), これらの一価染色体は不均一に両極に分配された (Figs. 3-2c, d). 第二減数分裂以降では, 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. 3-2e-g). さらに, 一部の分裂細胞ではこのような染色体行動をとらないものも認められた (Fig. 3-3). 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. 3-3a, 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, 両極に分裂するものも観察された (Fig. 3-3c). その結果, 半数体ブントンにおける四分子期では一分子から六分子の小胞子が観察された. それらの小胞子の大きさは, 二分子を除いてそれぞれの小胞子の大きさが不均一であった (Fig. 3-2h). さらに, 半数体ブントンと ‘晩白柚’の花粉四分子期における小胞子型の出現頻度を調査した結果 (Fig. 3-4), ‘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, 半数体ブントンでは, 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.

次に, 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, 第 1 章の結果 (98.0%) とほぼ同じであっ

た。しかしながら、半数体ブンタンの染色花粉の出現頻度は 14.1% であり、半数体ブンタンが初めて開花した 3 年前 (2001 年 5 月) に測定した値 (1.6%) より高くなっていた。これは、おそらく半数体ブンタンの樹勢が徐々に強くなってきたことによると考えられる。今後、経時的に半数体ブンタンの花粉稔性を調査していく必要がある。

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; Pooler・Scorza, 1995a; Veilleux, 1985; 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、半数体ブンタン ( $n=9$ ) 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、本実験の結果では、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、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胞子は二分子であることを報告している。

半数体ブンタンでは、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，第一減数分裂中期に 9 本の一価染色体の出現のみであり，さらに，一部の分裂細胞では第一減数分裂後期でいくつかの一価染色体が赤道面付近に残るものや，周りの細胞が第二減数分裂過程にあるにもかかわらず，両極に 9 本ずつ染色体が分裂するものも観察された．また，花粉四分子期の観察において，半数体ブントン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，アセト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．したがって，半数体ブントンにおいても半数体トウガラシと同様に稔性花粉が二分子由来であることが考えられる．おそらく，赤道面に 9 個の一価染色体が並列し，両極に 9 本ずつ染色分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，半数体ブントンにおいても 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，半数体ブントンと‘晩白柚’の雌ずい内における花粉管伸長について観察した結果，両者共に交配後 1 日には，柱頭上で多くのハッサク花粉の発芽が観察された（Fig. 3-5a）．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達しており（Fig. 3-5b），半数体ブントンと‘晩白柚’間で雌ずい内の花粉管伸長速度に大きな差は認められなかった．一方，雌ずい内の花粉管数について調査した結果，‘晩白柚’では，1 雌ずいあたり 15 程度の花柱溝が確認され，その中を花粉管が通過し，花柱最下部まで多数の花粉管が達していた．それに対し，半数体ブントンでは，雌ずいの中心部で花柱溝同士が癒合しており，ハッサクの花粉管伸長を阻

害していた。すなわち，子房に近づくにつれ，花粉管数が減少し，子房上部（花柱最下部）ではその数はわずかであった。

胚珠の大きさを測定した結果（Fig. 3-6），縦経はほぼいずれの時期も半数体ブンタンが小さかった。横経は開花前4日までは半数体ブンタン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（Fig. 3-7），‘晩白柚’では開花前12日より胚のう母細胞が観察され（Fig. 3-8a），その後，減数分裂→4分子→遊離核（1～8核）と発育が進み（Figs. 3-8b-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. 3-8g）。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，半数体ブンタンでは，開花前より開花後まで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. 3-9a）。また，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，半数体ブンタン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数観察された（Figs. 3-9b, 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）。本実験では，半数体ブンタン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

通常の速度で伸長したが、花柱最下部に到達する花粉管数はわずかであった。半数体ブンタンの雌ずい内は、花粉管が通る花粉溝が雌ずいの中心部で不規則に癒合する異常が確認された。さらに、胚のうちでは、開花後 2 日までの観察結果であるが、‘晩白柚’では胚のうち母細胞が形成され、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ちが観察され、正常な雌性配偶子形成が認められたのに対し、半数体ブンタンでは、‘晩白柚’と比べ雌性配偶子形成の異常が認められた。すなわち、半数体ブンタンでは外珠皮と内珠皮は形成されるものの、いずれの時期においても胚のうち母細胞は全く確認されなかった。第 1 章で半数体ブンタン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、第 2 章で半数体ブンタンに種々の二倍体カンキツ品種の花粉を交雑しても全く着果しなかった。すなわち、半数体ブンタンでは柱頭上で花粉管が正常に発芽するものの、花柱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ち母細胞が形成されず、胚のうち形成に至らないことで種子が形成できないものと考えられる。

以上の結果より、‘晩白柚’から得られた半数体ブンタンの雄性および雌性配偶子形成において、雄性配偶子では、ほとんどの分裂細胞で分裂異常が観察されたが、一部の分裂細胞で FDR のような退行現象が起こり、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、雌ずい中の花柱溝の異常と胚のうち母細胞の無形成によることが明らかとなった。

## 摘要

半数体ブントンの雄性配偶子および雌性配偶子の形成過程を観察するとともに、雄性配偶子の稔性回復機構について細胞遺伝学的解析を行った。

半数体ブントンの花粉母細胞における減数分裂過程を観察した結果、半数体ブントンは連続した2回の分裂を行っていたものの、ほとんどの分裂細胞で減数分裂の異常が認められた。一部の分裂細胞では、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や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、両極に分裂するものが観察された。さらに、花粉四分子期において、‘晩白柚’では99.3%が四分子であったのに対し、半数体ブントンでは、一分子から六分子の小孢子型が観察され、二分子が24.7%と、非常に高い頻度で出現していた。一方、雌性器官では、半数体ブントンの雌ずいの中心部で花柱溝同士が癒合しており、ハッサクの花粉管の伸長が阻害されていた。また、雌性配偶子形成では、胚のう母細胞が全く形成されないため、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。

以上より、半数体ブントンの雄性および雌性配偶子形成において、雄性配偶子では、ほとんどの分裂細胞で分裂異常が観察されたが、一部の分裂細胞でFDRのような退行現象が起こり、稔性を回復しているものと推測された。また、半数体ブントンの雌性不稔の原因として、雌ずい中の花柱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。



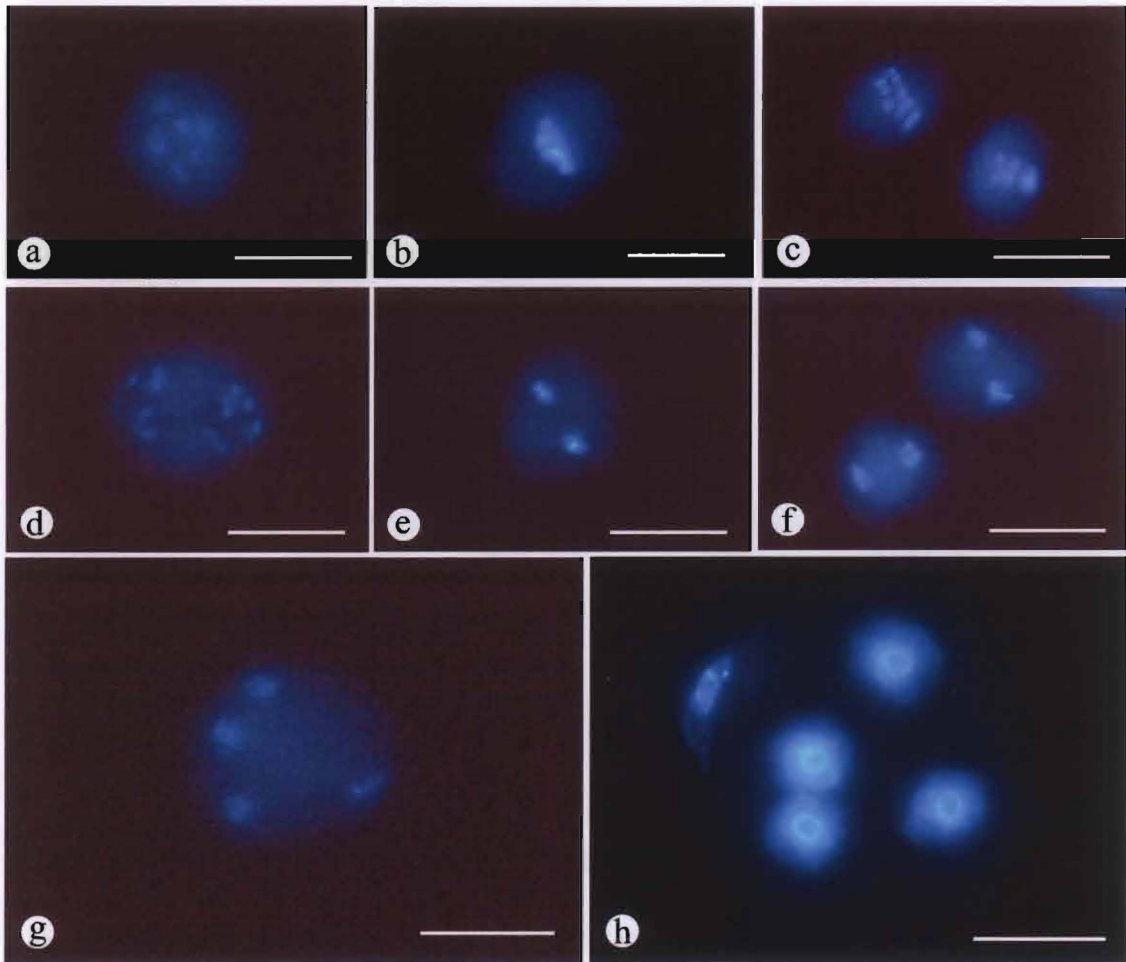


Fig. 3-1. Meiotic stages of pollen mother cells in 'Banpeiyu' pummelo. Bars=10  $\mu$ m.  
 a : Prophase I. b : Metaphase I. c : Anaphase I. d : Telophase I and Prophase II.  
 e : Metaphase II. f : Anaphase II. g : Telophase II. h : Tetrad stage.

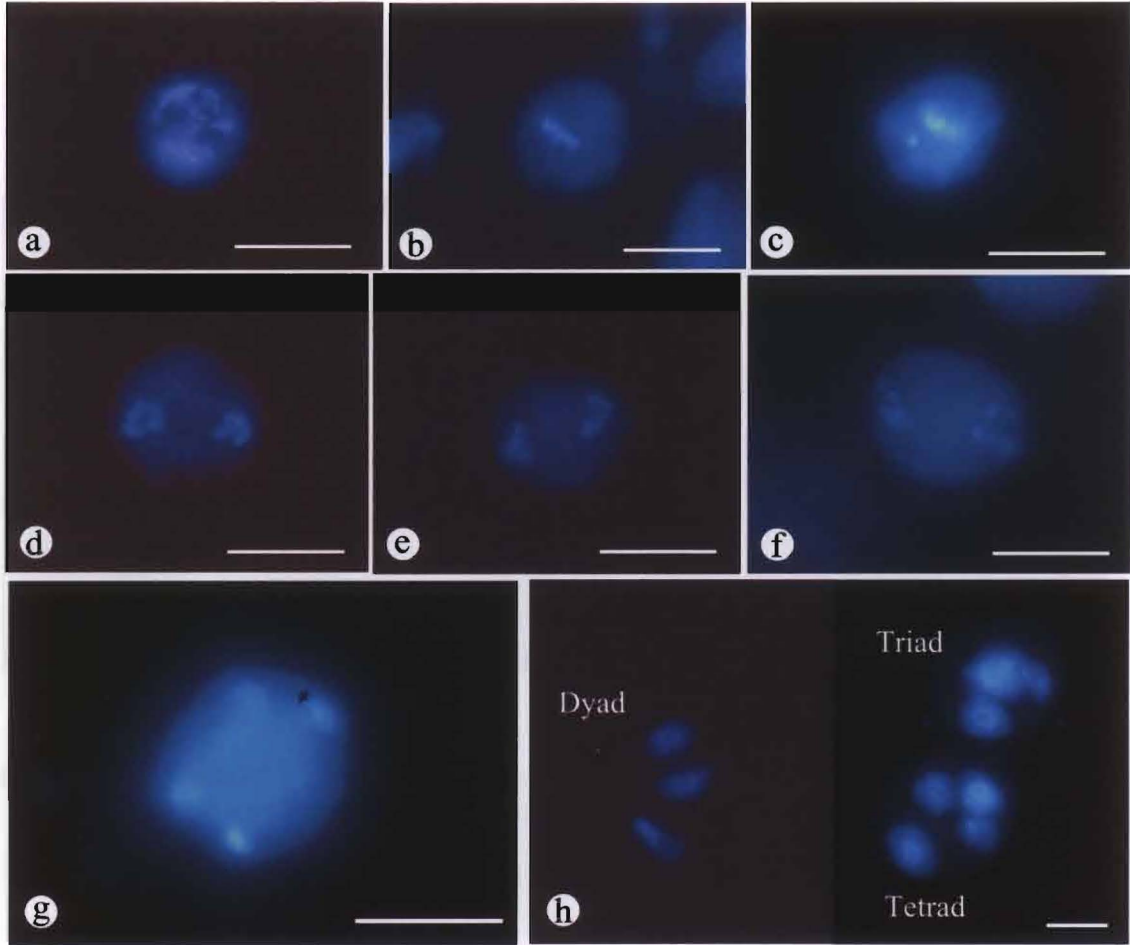


Fig. 3-2. Meiotic stages of pollen mother cells in the haploid pummelo. Bars=10  $\mu$ m.  
 a : Prophase I. b : Metaphase I. c : Anaphase I. d : Telophase I and Prophase II.  
 e : Metaphase II. f : Anaphase II. g : Telophase II. h : Tetrads stage.

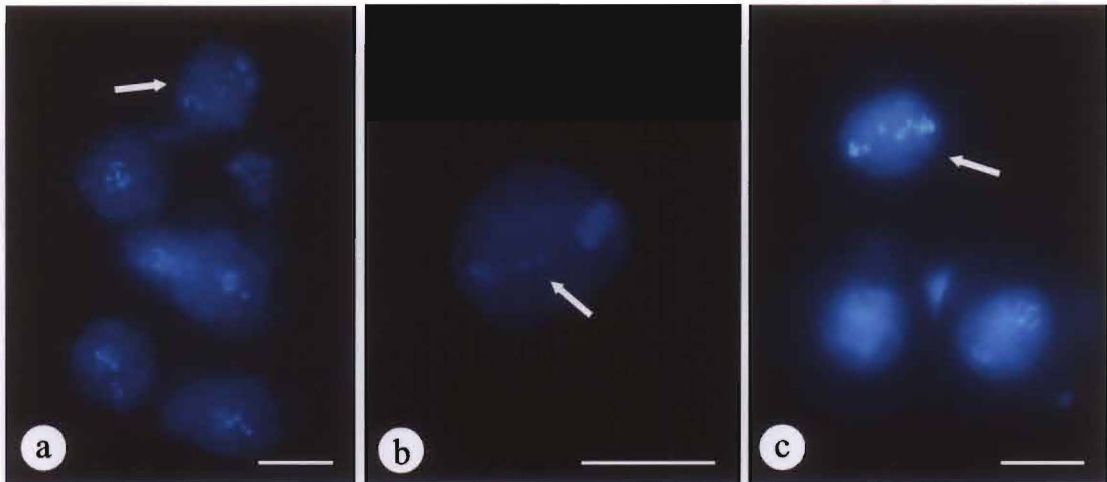


Fig. 3-3. Abnormalities of meiotic stage of pollen mother cells in the haploid pummelo. Bars=10  $\mu$ m. Arrows indicate the abnormal cells.  
a, b : Chromosomes remained in equatorial plate.  
c : 9 bivalents lined in equatorial plate.

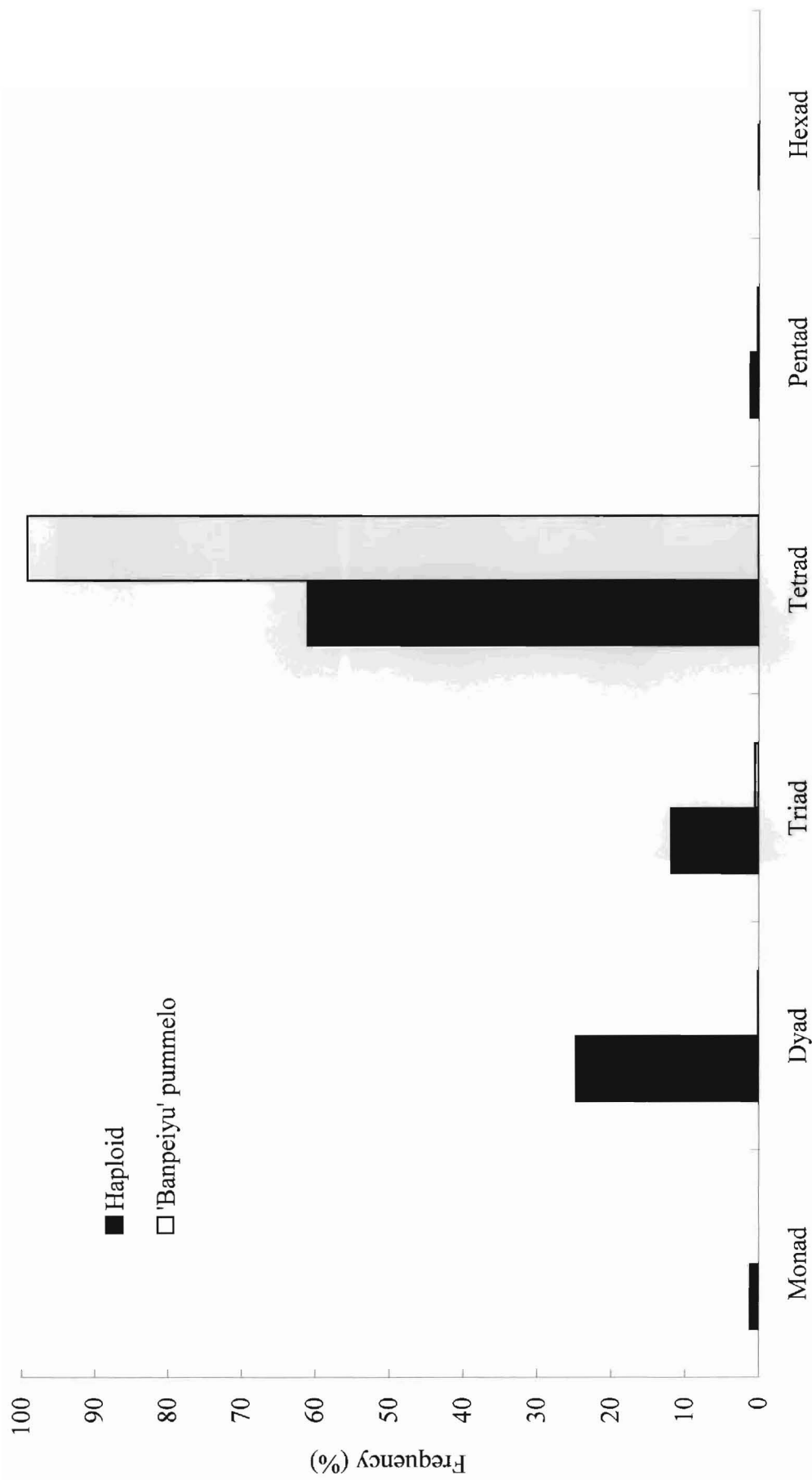


Fig. 3-4. Frequency of appearance of the microspore type in the tetrad stage of the haploid pummelo and 'Banpeiyu' pummelo.

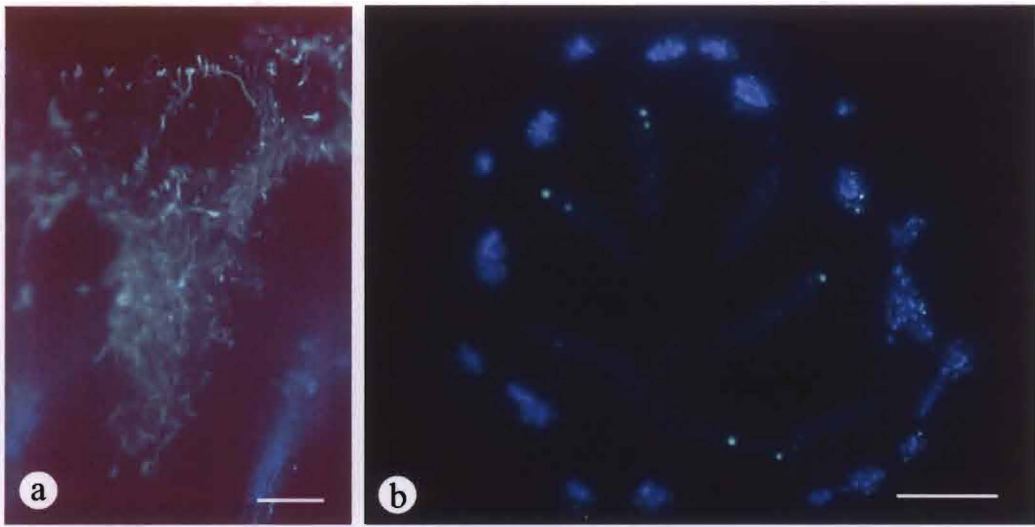


Fig. 3-5. Pollen tube elongation in pistils of the haploid pummelo. Bars=200  $\mu$ m.  
a : Stigma. b : Base of the style.

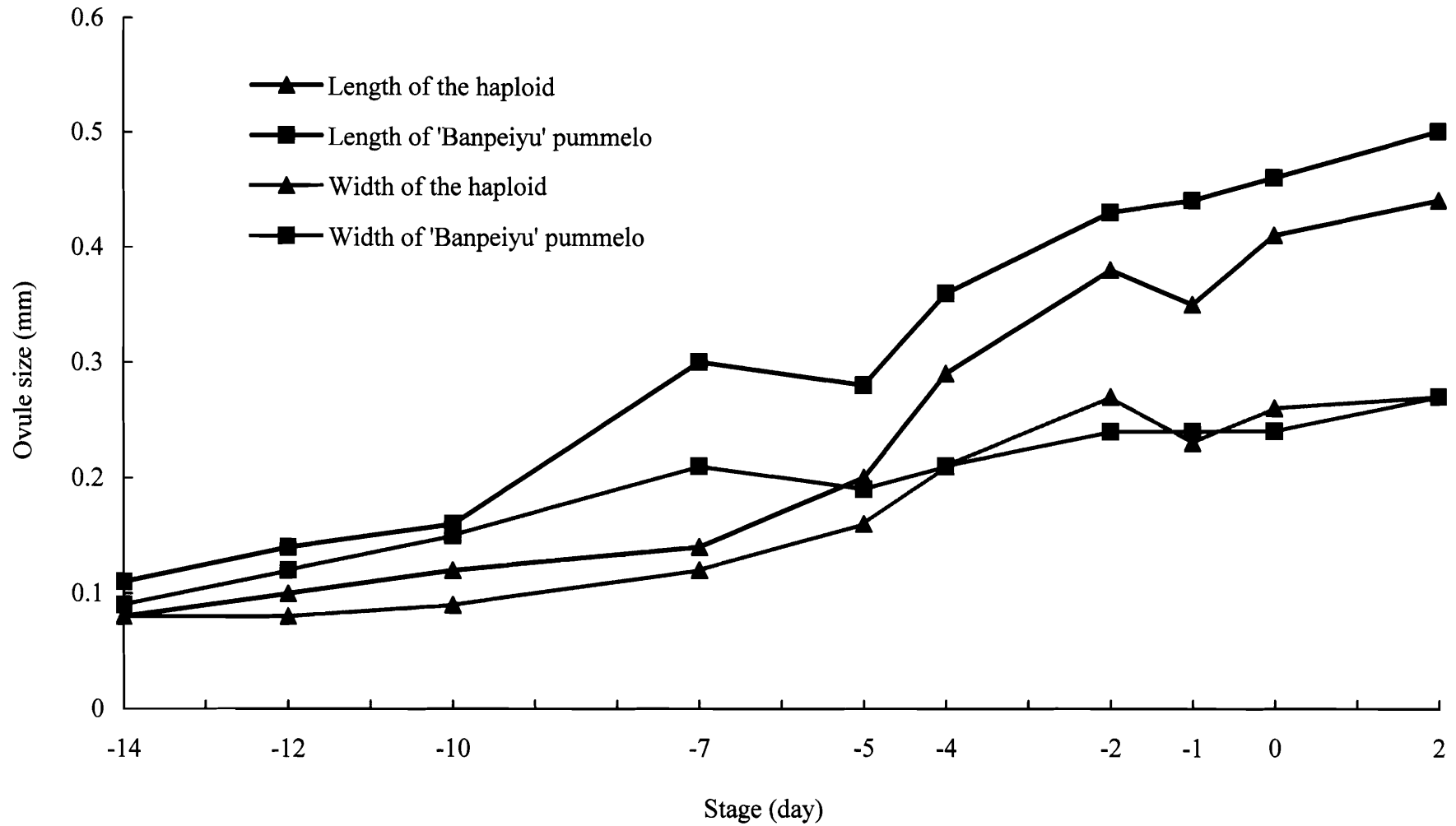


Fig. 3-6. Comparison of length and width of ovules in the haploid pummelo and 'Banpeiyu' pummelo from 14 days before flowering to 2 days after flowering.

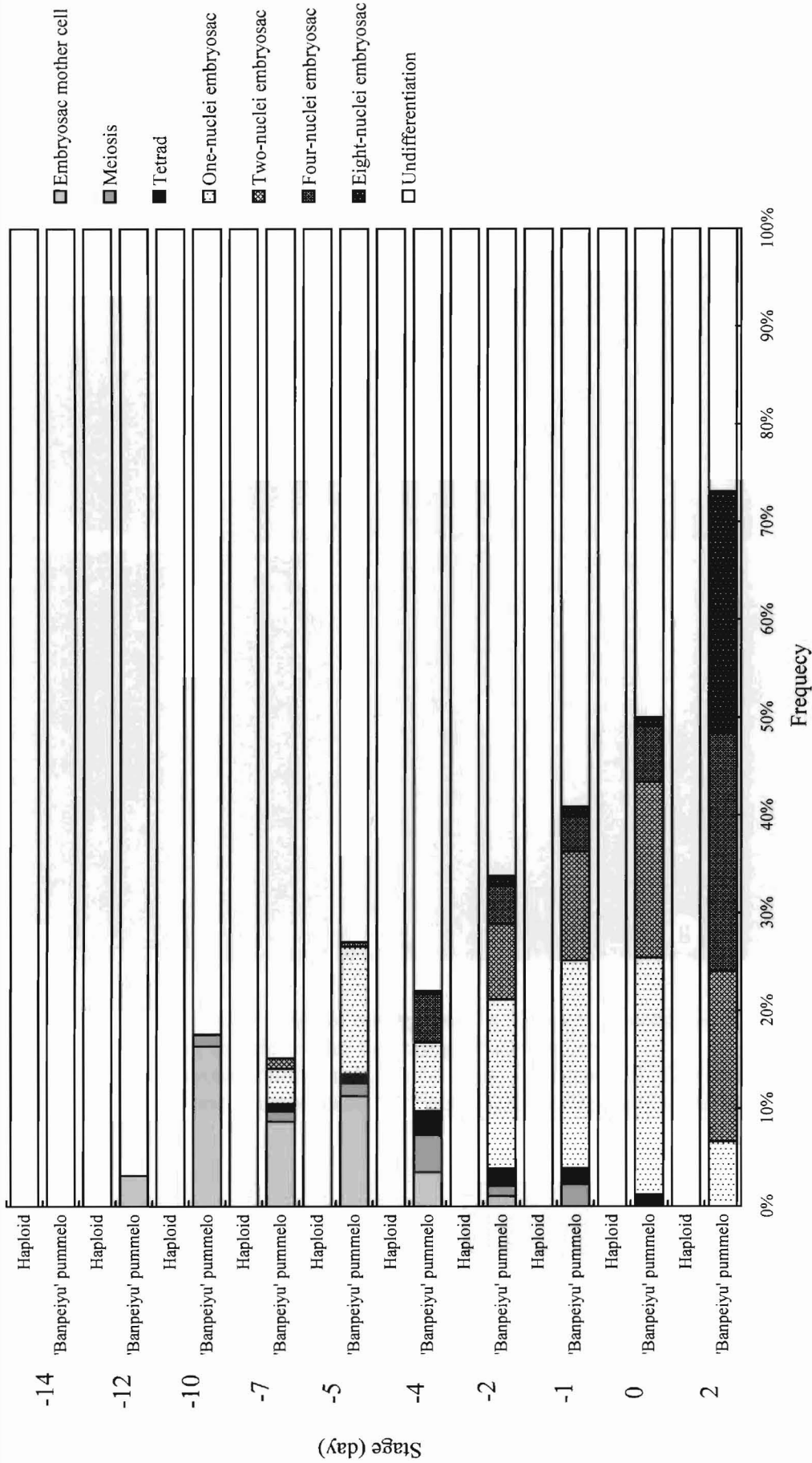


Fig. 3-7. Comparison of the developmental stage of embryos in the haploid pummelo and 'Banpeiyu' pummelo from 14 days before flowering to 2 days after flowering.



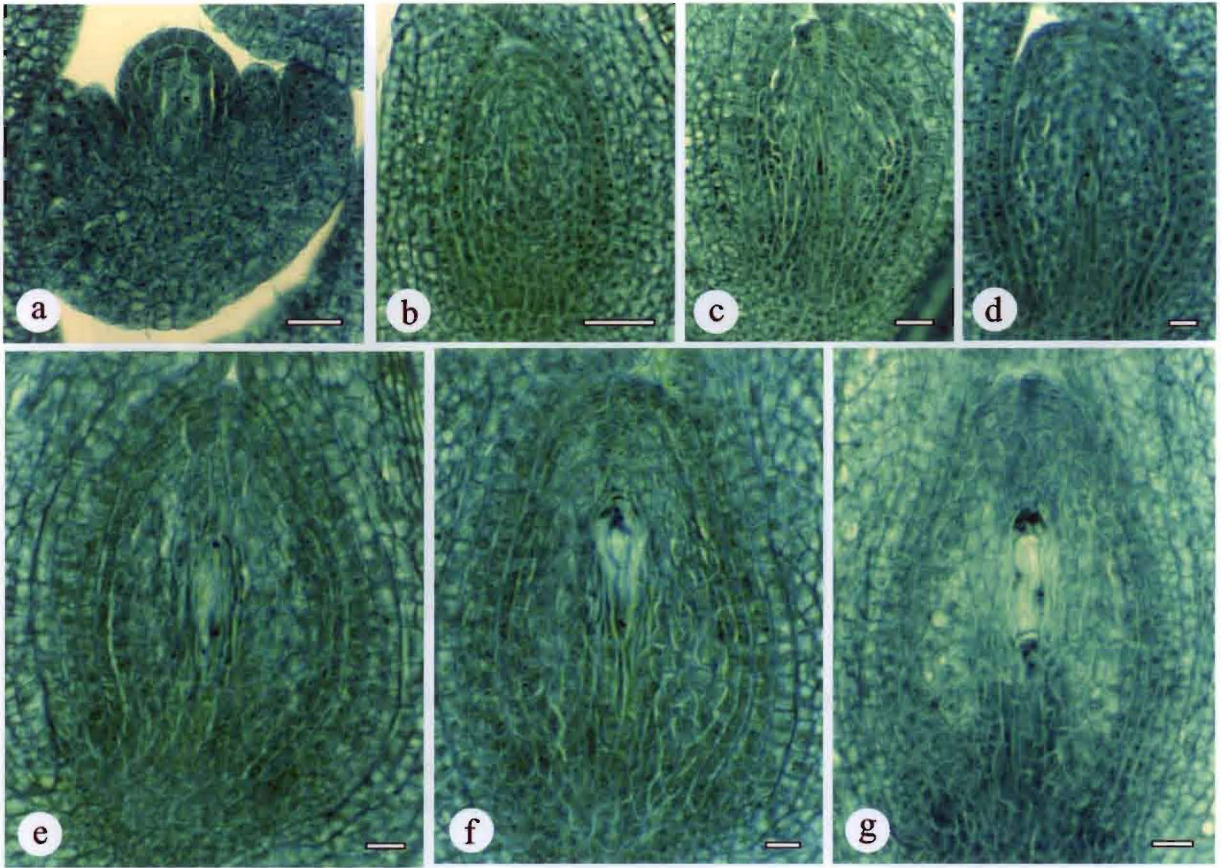


Fig. 3-8. Developmental stage of embryo sacs in 'Banpeiyu' pummelo from 14 days before flowering to 2 days after flowering. Bars=10  $\mu$ m.  
 a : Embryosac mother cell. b : Meiosis. c : Tetrad. d : One-nuclei embryosac.  
 e : Two-nuclei embryosac. f : Four-nuclei embryosac. g : Eight-nuclei embryosac.



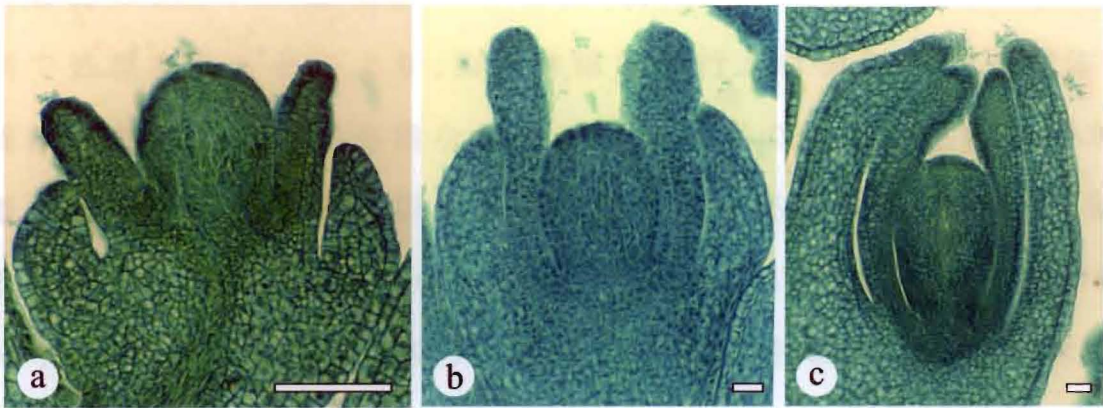


Fig. 3-9. Abnormalities of ovules in the haploid pummelo. Bars=20  $\mu$ m.  
a : 14 days before flowering.  
b : 4 days before flowering.  
c : 2 days before flowering.

緒言

半数体植物は，二倍体と比べて，生育が貧弱であり，高い不稔性を示すため，そのまま栽培品種として利用することはほとんどない。しかしながら，相同ゲノムを1個しかもたないことから，形質の選抜が容易であり，コルヒチンやオリザリンなどといった有糸分裂阻害剤で処理することにより，染色体倍加を行えば直ちにホモ個体（純系個体）を得ることが可能なため，有用形質の座乗染色体の同定や核型分析などの遺伝子解析や計画育種を進めるための重要な育種素材となり得る（Bajaj, 1990；Ochatt・Zhang, 1996；Wanら, 1989；1991；Wan・Widholm, 1995）。実際に，草本性植物では，半数体植物が，減数分裂における染色体行動などの細胞遺伝学的解析，耐寒性，耐乾性，耐病性などの遺伝解析およびF<sub>1</sub>育種による品種育成など多岐にわたって利用されている（Kanekoら, 2003；Lotfiら, 2003；Qu・Hancock, 2002；Sulistyaningsihら, 2002；Toscaら, 1995；Yanら, 2000）。

果樹における半数体は，リンゴ，ナシ，モモ，キウイフルーツ，オウトウおよびバナナなどで獲得されており，コルヒチンやオリザリン処理により，多くの種，品種および系統で倍加半数体が誘導されている（Assaniら, 2003；Bouvierら, 2002；Chalak・Legave, 1996；Hofer・Grafe, 2003；Ochatt・Zhang, 1996；Toyama, 1974；Zhang・Lespinasse, 1991）。特に，モモではコルヒチン処理で誘導された倍加半数体が開花結実に至っている。さらに，倍加系統間で交雑が行

われ，得られた  $F_1$  雑種における遺伝解析や生育状態，果実品質の特性調査が行われている (Pooler・Scorza, 1995b; Scorza・Pooler, 1999)．カンキツ類では，これまでにいくつかの半数体が獲得されているものの (Germana・Chiancone, 2001; 2003; Hidaka ら, 1979; Karasawa, 1971; Oiyama・Kobayashi, 1993)，倍加半数体に関する報告は，Germana・Chiancone (2003) がクレメンティンの薬培養から誘導したもののみである．

一方，Toolapong ら (1996) が育成した半数体ブンタンは，第 1 章，第 2 章および第 3 章の結果より，雌性配偶子には全く稔性がなく，雄性配偶子も極めて低い稔性であるため，遺伝解析や計画育種に半数体ブンタンを用いるのは非常に困難である．

そこで本章では，半数体ブンタンの新梢の腋芽にコルヒチン処理を行うことによって，倍加半数体の作出を試みた．

## 材料および方法

材料には，第 1 章と同様に接木 5 年生の半数体ブンタンを供試した．処理方法は，9 月下旬に硬化した新梢の先端にコルヒチン溶液を浸漬した脱脂綿を 10 日間巻き付け，乾燥防止のために脱脂綿にパラフィルムを被覆した．コルヒチンの処理濃度は，0.05, 0.1 および 0.2% とした．2 か月後，新しく萌芽した新梢の倍数性解析を行った．倍数性を確認後，得られた細胞キメラ個体の新梢を 1 芽ずつ採取し，カラタチ台に高接ぎを行った．さらに，2 か月後，新たに発生した新梢の倍数性を解析した．

倍数性の解析には，コルヒチン処理後に萌芽した幼葉を用い，第1章と同様にフローサイトメーターによる方法と酵素解離による染色体観察法を適用した．また，得られた倍加半数体と半数体ブンタンの遺伝的等質性を解析するために，第2章と同様に RAPD 分析と CMA 染色による核型分析を行った．なお，RAPD 分析には，10mer のランダムプライマー6種類（OPA-11，OPA-18，OPB-5，OPB-7，OPB-11，OPB-15）を使用した．

さらに，‘晩白柚’，半数体ブンタン，倍加系統および半数体と二倍体ならびに二倍体と四倍体の細胞キメラ個体における葉の形態的特徴を調査した．調査項目は単位面積あたりの葉重と気孔の縦径と横径とし，それぞれ 10 反復ずつ行った．

### 結果および考察

半数体ブンタンの新梢にコルヒチン処理を行った結果，2 か月後には，すべての処理区で萌芽が観察された．萌芽してきた新梢の中には，短い節間，丸みを帯びた葉，濃緑色の葉または厚い葉などの形態の異常を示すものも認められた．それらの新梢の倍数性をフローサイトメーターと染色体観察により解析した結果（Fig. 4-1, Table 4-1），半数体，半数体と二倍体の細胞キメラおよび二倍体と四倍体の細胞キメラが確認された．半数体と二倍体の細胞キメラは，0.05，0.1，0.2%の処理区でそれぞれ 40.0，25.0，37.5%と高い頻度で得られた．一方，0.05%と 0.1%の処理区で，二倍体と四倍体の細胞キメラが，それぞれ 20.0%と 12.5%の頻度で得られた．なお，二倍体あ

るいは四倍体はいずれの処理区からも獲得することができなかった。

そこで、得られたいくつかの細胞キメラをカラタチ台に一芽接ぎし、接木2か月後に発生した新梢の倍数性をフローサイトメーターで解析した。その結果 (Table 4-2)、半数体と二倍体の細胞キメラの中にはその状態を維持する系統もみられたが、半数体に先祖返りするものも観察された。二倍体と四倍体の細胞キメラにおいても同様の現象が認められた。二倍体と四倍体の細胞キメラ系統である B-1 から2つの芽が得られ、それぞれカラタチ台に一芽接ぎを行い、新たに発生した新梢をフローサイトメーターで解析した結果、一方は、相対蛍光強度が二倍体と四倍体の2つピークが確認され、倍数性がそのままの状態である二倍体と四倍体の細胞キメラ (B-1-2) を示したが、もう一方は、相対蛍光強度のピークが二倍体のみ (B-1-1) でしか認められなかった (Fig. 4-2a)。さらに、この二倍体系統の幼葉の染色体観察を行った結果 (Fig. 4-2b)、観察したすべての細胞において18本の染色体が認められ、二倍体であることが明らかとなった。この二倍体は半数体ブントンと比べ成長が非常に旺盛で (Fig. 4-2c)、トゲの発生が観察された (Fig. 4-2d)。

腋芽、種子およびカルスなどにコルヒチンやオリザリンのような有糸分裂阻害剤の処理を行うと、多くの細胞キメラが出現することが、ナシ、カンキツ、キンカン、キウイフルーツ、ブドウおよびバナナなどの多くの果樹で報告されている (Chalak・Legave, 1996; Kadota・Niimi, 2002; Notsukaら, 2000; Van Durenら, 1996; Wu・Mooney, 2002; 八幡ら, 2004)。Notsukaら (2000) はブドウの試験管内でのコルヒチン処理において、誘導された二倍体と四倍体の細胞キメラをさらに株分けすることによって四倍体を獲得している。

本実験では、カラタチ台に高接ぎすることによって二倍体と四倍体の細胞キメラから二倍体 (B-1-1) を獲得することができた。この細胞キメラはおそらく区分キメラであったものと推測される。

次に、‘晩白柚’、半数体ブンタン、新梢へのコルヒチン処理と高接ぎによって得られた二倍体系統 (B-1-1)、半数体と二倍体 (A-1-1) および二倍体と四倍体の細胞キメラ (B-1-2) における単位面積あたりの葉重と気孔の大きさを比較した (Table 4-3)。すなわち、単位面積あたりの葉重は、‘晩白柚’、半数体、A-1-1、B-1-1 および B-1-2 でそれぞれ 37.3, 21.4, 31.4, 36.9 および 51.6mg/cm<sup>2</sup> であった。B-1-1 の単位面積あたりの葉重は半数体ブンタンより有意に重く、葉が厚くなっており、‘晩白柚’ とほぼ同じであった。気孔の大きさは、B-1-1 の気孔の縦経と横経は半数体ブンタンより有意に大きかった。また、‘晩白柚’、B-1-1、A-1-1 および B-1-2 間で気孔の大きさに有意な差は認められなかった。

二倍体と四倍体の細胞キメラから得られた二倍体系統 B-1-1 と半数体ブンタンとの遺伝的等質性を解析するために、‘晩白柚’、半数体ブンタンおよび B-1-1 で RAPD 分析を行った。その結果 (Fig. 4-3)、B-1-1 は ‘晩白柚’ の特異的なバンドを有しており、半数体ブンタンと同様のバンドパターンを示した。さらに、CMA 染色により、半数体ブンタンと B-1-1 の染色体構成を調査した結果 (Fig. 4-4)、半数体ブンタンの染色体構成は、1A+1B+1C+2D+4E であったのに対し (Fig. 4-4a)、B-1-1 は 2A+2B+2C+4D+8E であり (Fig. 4-4b)、それぞれの染色体が半数体ブンタンの倍になっていた。このように、RAPD 分析と CMA 染色により、B-1-1 は倍加半数体であることが確認された。カンキツ類の半数体植物から旺盛な成長を示す倍加半数

体植物を作出したのは本実験がはじめての報告である。

現在までにカンキツ類の倍加半数体の同定方法にはアイソザイム, RAPD およびマイクロサテライト分析が用いられてきた (Germana ら, 1994, 2000 ; Germana・Chiancone, 2003). しかしながら, 第2章で述べたとおり, 酵素解離と蛍光染色の組合せによる染色体マッピング技術は, カンキツ類の染色体の同定に利用され, ゲノム解析や細胞融合, 倍数性育種などの様々な生物工学的研究に応用されている (Befu ら, 2000 ; Guerra, 1993 ; Miranda ら, 1997a, b ; Pedrosa ら, 2000 ; Yamamoto・Tominaga, 2003 ; 楊ら, 2002). Yamamoto・Tominaga (2004) は, CMA 染色を用いることによって, クレメンティンの半数体から発生した半数体と二倍体の周縁キメラにおける二倍体細胞が倍加半数体の細胞であることを証明している. 本実験においても, CMA 染色によりコルヒチン処理と一芽接ぎによって得られた二倍体系統が, 半数体ブントンの倍加半数体であることを容易に同定することができた. したがって, CMA 染色による染色体構成の解析は, カンキツにおける倍加半数体を同定するための, 簡便で有効な方法であると考えられる.

カンキツをはじめとする被子植物の茎頂分裂組織は, 3 つの組織分化層から構成されおり, 組織分化層は外側から第 I 層, 第 II 層および第 III 層と呼ばれている. 各層はそれぞれ特定の器官・組織に分化し, カンキツでは, 第 I 層からは表皮系が形成される. 第 II 層は生殖組織 (花粉や胚珠), 茎の皮層や通導組織, 葉や子房の下皮組織を分化し, 葉や茎の中心部や子房の内部は第 III 層に由来する (Frost・Krug, 1942 ; Sugawara ら, 2002). 葉では, 第 I 層が表皮を, 第 II 層と第 III 層は葉肉組織を形成する. 本実験において, 二倍

体と四倍体の細胞キメラである B-1-2 は，‘晩白柚’と比較して，気孔の大きさが同程度であり，葉が厚くなっていた．また，様々な位置の枝において葉の倍数性を解析した結果，調査したすべての葉が二倍体と四倍体の細胞キメラであった．これらの結果から，B-1-2 は完全な二倍体と四倍体の細胞キメラであると考えられ，第 I 層が二倍体であり，第 II 層と第 III 層が四倍体あるいは二倍体と四倍体の細胞から形成されているものと推察される．Frost・Krug（1942）は，花粉や胚珠などの生殖組織が第 II 層から形成されることを報告しており，B-1-2 の第 II 層の細胞が四倍体であったなら，三倍体育種の親としても重要な材料となると思われる．今後の研究として，この細胞キメラの組織分化層の倍数性を明らかにする必要がある．

本実験では，半数体ブンタンの新梢の腋芽へのコルヒチン処理と処理後発生した新梢の一芽接ぎを併用することにより二倍体と四倍体の細胞キメラから二倍体を得られた．この二倍体は半数体ブンタンと比較して旺盛な成長を示し，トゲの発生が確認された．また，この二倍体の単位面積あたりの葉重と気孔の大きさは，半数体ブンタンより有意に重く，大きくなり，また，‘晩白柚’と同様の値を示した．さらに，RAPD 分析と CMA 染色による染色体構成の結果より，この二倍体は半数体ブンタンの倍加半数体であることが確認された．この倍加半数体は，ブンタンをはじめとするカンキツの遺伝解析や計画育種を行う上で極めて重要な材料になるであろう．



## 摘要

半数体ブンタンの倍加半数体を作成するために、新梢の腋芽にコルヒチン処理を行った。処理された腋芽から新たに発生した新梢の倍数性は、もとの半数体以外に、半数体と二倍体および二倍体と四倍体の細胞キメラであった。二倍体と四倍体の細胞キメラをカラタチ台に一芽接ぎしたところ、二倍体と四倍体の細胞キメラ以外に、染色体数が18本の二倍体を得られた。この二倍体系統は半数体ブンタンと比較して旺盛な成長を示した。二倍体系統の単位面積あたりの葉重と気孔の大きさを調査したところ、半数体ブンタンより有意に重くて大きく、‘晩白柚’と同様の値を示した。RAPD分析を行った結果、二倍体系統は半数体ブンタンと同様のバンドパターンであった。また、CMA染色による染色体構成を調査した結果、二倍体系統の染色体構成は、それぞれの染色体が半数体ブンタンの倍になっていた。以上より、この二倍体は半数体ブンタンの倍加半数体であることが確認された。

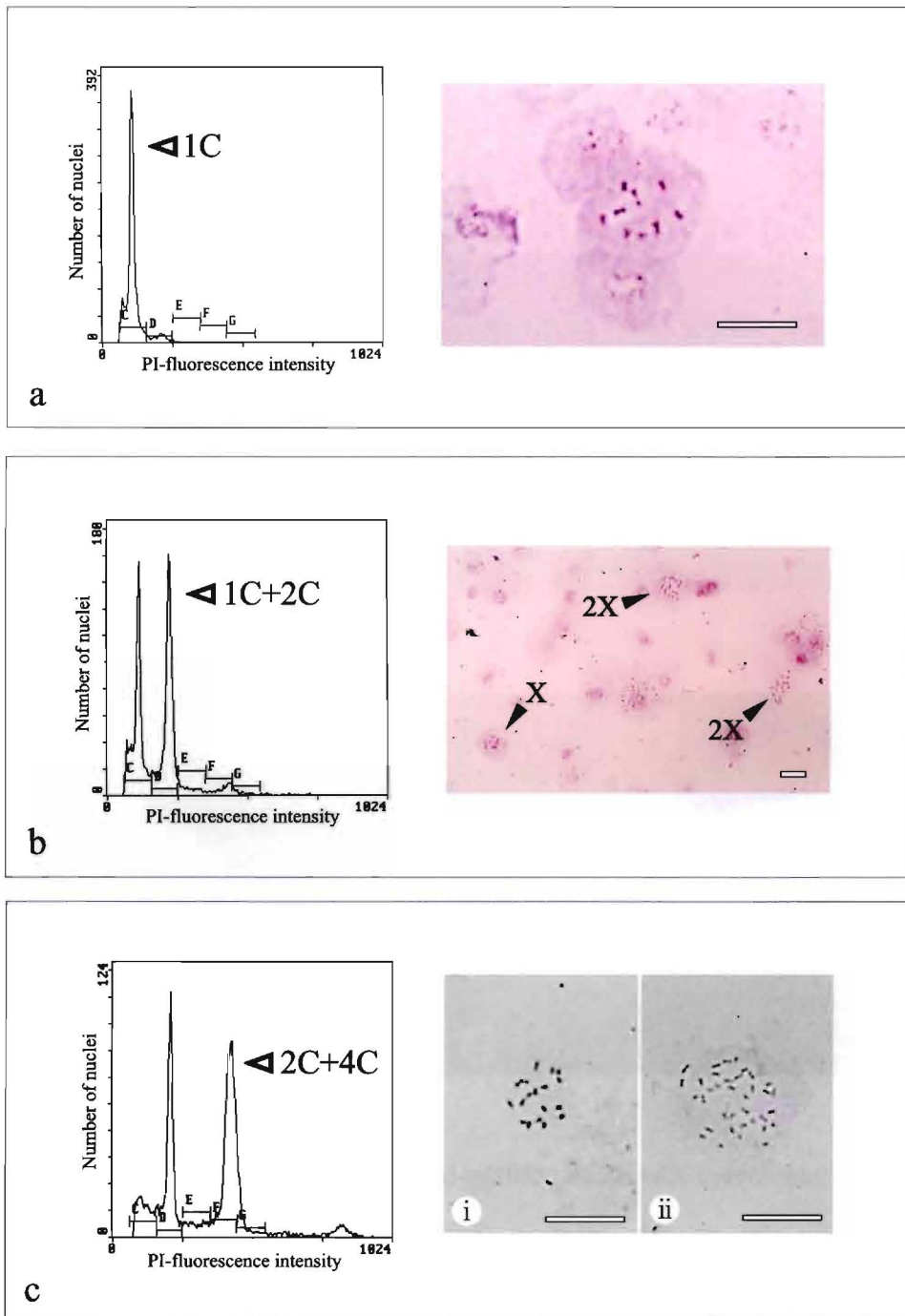


Fig. 4-1. Flow cytometric analysis and chromosome observation of new sprouting shoots obtained from colchicine treatment to axillary shoot buds of the haploid pummelo. Bars=20 μm.  
 a : Haploid ( $2n=X=9$ ).  
 b : Cytochimera [haploid ( $2n=X=9$ ) and diploid ( $2n=2X=18$ )].  
 c : Cytochimera [diploid (i:  $2n=2X=18$ ) and tetraploid (ii:  $2n=4X=36$ )].

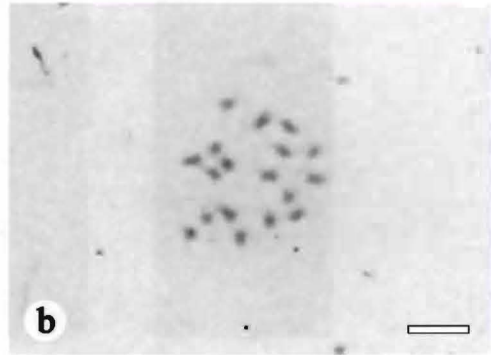
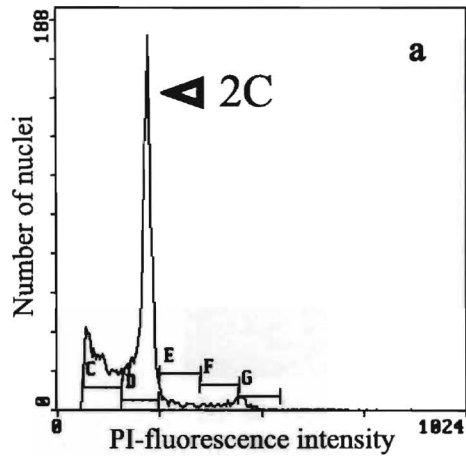


Fig. 4-2. Doubled haploid obtained from bud-grafting of 2X+4X cytochimera.  
 a : Flow cytometric analysis.  
 b : Somatic chromosomes of a young leaf cell ( $2n=2X=18$ ). Bar=10  $\mu\text{m}$ .  
 c : Comparison of initial growth between the haploid pummelo (left) and doubled haploid (right), one year after grafting. Bar=10 cm.  
 d : Occurrence of thorn on the shoot of doubled haploid. Bar=1 cm.

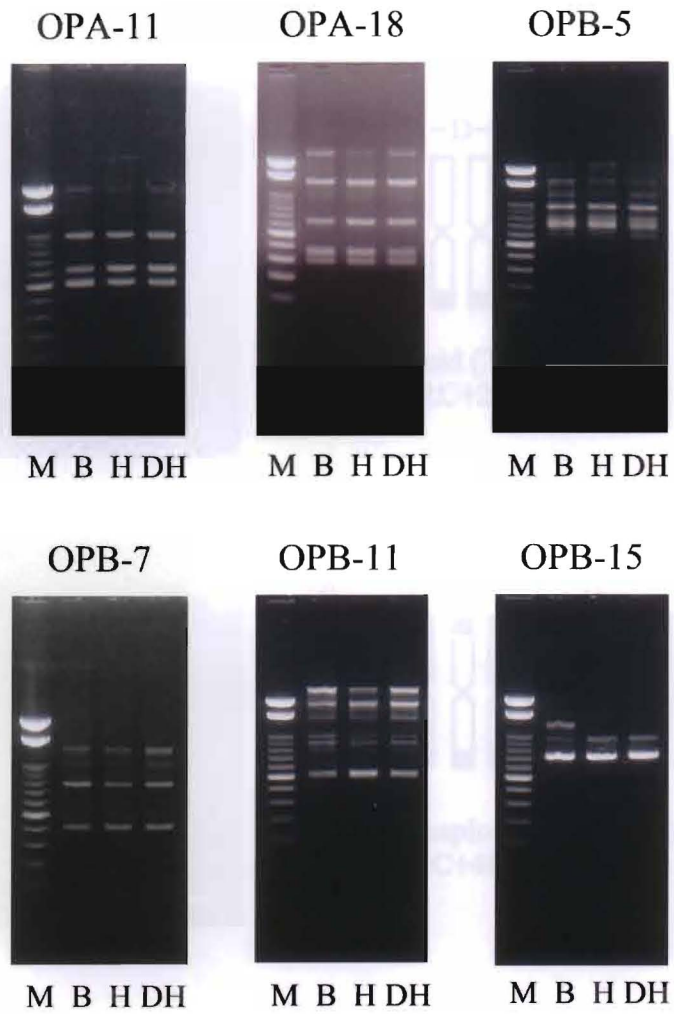
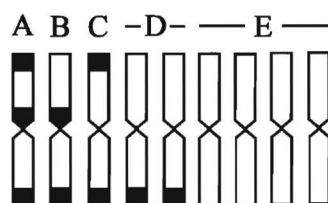
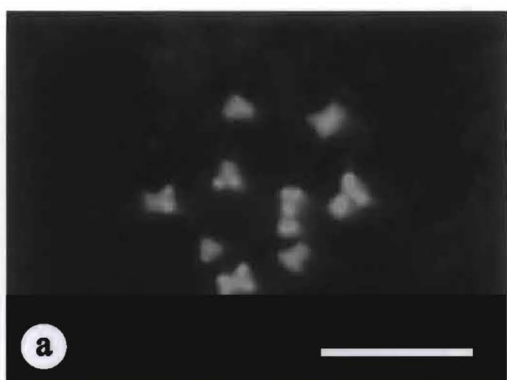
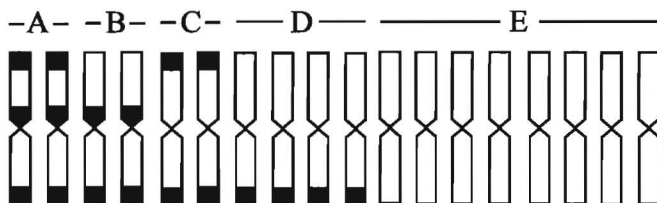
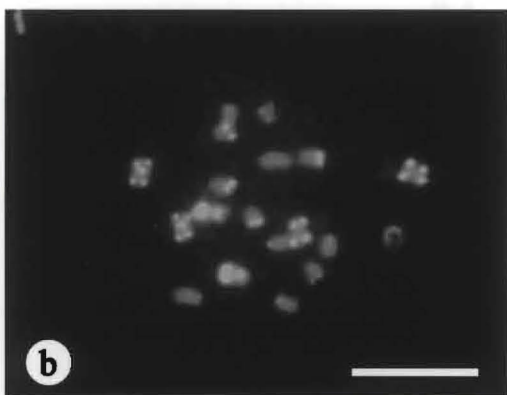


Fig. 4-3. RAPD analysis on 'Banpeiyu' pummelo, the haploid pummelo, and doubled haploid.  
M : 100bp ladder marker. B : 'Banpeiyu' pummelo.  
H : The haploid. DH : Doubled haploid.



The haploid ( $2n=X=9$ )  
 $1A+1B+1C+2D+4E$



Doubled haploid ( $2n=2X=18$ )  
 $2A+2B+2C+4D+8E$

Fig. 4-4. Photographs and idiograms of CMA banding patterns in the somatic chromosomes of the haploid pummelo (a) and doubled haploid (b). Bars=10  $\mu$ m.  
 The black regions shown in the idiograms indicate CMA positive bands.  
 A : Telomeric band in both arms and proximal band in one arm.  
 B : Telomeric band in one arm and proximal band in the other arm.  
 C : Telomeric band in both arms.  
 D : Telomeric band in one arm. E : No band.

Table 4-1. Effect of colchicine concentration on rate of polyploid induction in current shoots of the haploid pummelo.

Colchicine concentration (%)	No. of current shoot treated	No. of sprouting	% of sprouting	Total no. of new shoot	Ploidy level			
					X (%)	X+2X (%)	2X (%)	
0.05	6	4	66.7	5	2(40.0)	2(40.0)	0(0)	1(20.0)
0.1	8	6	75.0	8	5(62.5)	2(25.0)	0(0)	1(12.5)
0.2	7	4	57.1	8	5(62.5)	3(37.5)	0(0)	0(0)

Table 4-2. Ploidy level of shoots obtained from bud-grafting of cytochimera.

Strains of cytochimera	Strains after bud-grafting	Ploidy level
A-1 (X+2X)	1	X+2X
	2	X+2X
	3	X+2X
	4	X+2X
	5	X+2X
	6	X+2X
	7	X+2X
	8	X+2X
A-2 (X+2X)	1	X
A-3 (X+2X)	1	X
	2	X
B-1 (2X+4X)	1	2X
	2	2X+4X

Table 4-3. Comparison of leaf weight and stomata size in 'Banpeiyu' pummelo, the haploid pummelo, doubled haploid, and cytochimera (X+2X and 2X+4X).

Strains	Ploidy level	Leaf weight (mg/cm <sup>2</sup> )	Stomata (µm)	
			Length	Width
'Banpeiyu' pummelo	2X	37.3b <sup>z</sup>	22.1a	20.3a
Haploid	X	21.4d	17.0b	15.1b
A-1-1	X+2X	31.4c	22.6a	20.2a
B-1-1	2X	36.9b	22.4a	20.4a
B-1-2	2X+4X	51.6a	22.8a	20.4a

<sup>z</sup> Different letters represent significant differences in Tukey's multiple range test, 1% level.



## 第 5 章 総合考察

果樹などの永年作物は、雑種性が強く、播種から開花結実に至るまで長年月を要するため、有用形質に関する遺伝情報が乏しく、計画的な育種の推進が困難である。また、自家不和合性、雌雄性不稔性および多胚性の特徴を有するものが多く、優良品種間で交雑が困難な場合が多い。半数体は、その染色体を倍加することによって容易に純系個体を得られることから遺伝解析や計画育種を行う上で極めて有用と考えられる。さらに、カンキツ類では、二倍体との非対称細胞融合によって直接、無核となる三倍体雑種が得られるなど、半数体は極めて有用な材料である。

カンキツ類における半数体は、ナツダイダイの種子に X 線を照射することにより初めて作出された (Karasawa, 1971)。それ以降、カンキツ類において半数体の作出に関する研究が盛んに行われ、薬培養によりカラタチ、シキキツおよびクレメンティンの半数体が誘導され、また、三倍体を交配することでクレメンティンと‘リー’の半数体の獲得に成功している (Chen ら, 1980; Germana・Chiancone, 2001; 2003; Hidaka ら, 1979; Oiyama・Kobayashi, 1993)。一方、春崎 (1996) は、‘宮内’イヨカンとカラタチから得られた小粒種子から半数体を 1 個体ずつ獲得している。このように、カンキツ類では様々な手法でいくつかの半数体の獲得に成功している。しかしながら、これらの半数体は、樹勢が極めて弱いため、枯死するものやほとんど成長しないものが多い。そのため、カンキツ類では草本性植物の半数体のような遺伝解析や品種改良に利用されるどころか、形態や生殖機能などの半数体植物に関する基礎的情報もほとんどな

い。最近，Toolapong ら（1996）は，ブンタン品種である‘晩白柚’の小粒種子から 1 個体の半数体を獲得した。この半数体ブンタンはこれまで獲得された半数体とは異なり，旺盛な成長を示し，発芽 7 年目でカンキツ類の半数体で初めて開花し，さらに，3 年後に結実した。本研究では，半数体ブンタンについて，葉，花，花粉および果実の形態調査，雌性と雄性配偶子の生殖機能の解析および倍加半数体の作出を行った。

半数体ブンタンの形態調査を行ったところ，半数体ブンタンの葉，花および果実は‘晩白柚’と比較して有意に小さくなっており，さらに，半数体ブンタンの花器は奇形を示した。しかしながら，花粉と胚珠が形成されており，花粉にはわずかながらに稔性が認められた。そこで，半数体ブンタンの生殖機能を評価するために二倍体カンキツ品種との交雑を行ったところ，半数体ブンタン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，半数体ブンタンを花粉親とした場合，二倍体の雑種後代が得られ，稔性花粉（ $n=9$ ）が形成されていることが確認された。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ため，減数分裂が行われても不稔となるのが普通である。しかしながら，中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。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ある。そこで，本研究の材料である半数体ブンタンの雌性および雄性配偶子の形成過程を調査した結果，雌性器官では，雌ずい中の花柱溝の異常と胚のう母細胞が形成されず胚のう形成に至らないことが

確認できた。一方、雄性配偶子形成では、ほとんどの分裂細胞では減数分裂の異常が認められたものの、一部の分裂細胞では、第一分裂復旧（FDR）により半数体の稔性を回復しているものと推測された。本研究では、カンキツ類の半数体植物の形態的特徴および生殖機能に関する基礎的情報を獲得することができた。今後、これらの情報は遺伝育種の貴重な資料となるものと思われる。

半数体は一般的に、その染色体を倍加したいわゆる倍加半数体として利用することがほとんどである（Lotfi ら, 2003; Qu・Hancock, 2002; Tosca ら, 1995）。本研究では、‘晩白柚’から得られた半数体ブンタンの新梢にコルヒチン进行处理することにより、倍加半数体を作成することができた。リンゴ、ナシおよびモモなどのバラ科果樹では、偽授精胚珠培養や葯培養などにより多くの半数体が誘導され、そのほとんどで倍加半数体系統が獲得されている。特に、モモでは倍加系統間で交雑が行われ、得られた F<sub>1</sub> 雑種における遺伝解析や生育状態、果実品質の特性調査が行われている（Pooler・Scorza, 1995b; Scorza・Pooler, 1999）。一方、カンキツ類では、倍加半数体の育成は極めて少なく、Germana・Chiancone（2003）が葯培養によって誘導したクレメンティンのみであり、モモなどと比較するとカンキツ類の半数体を用いた育種や遺伝解析への利用は非常に遅れている。この原因として、カンキツ類では効率的な半数体の作出方法が確立されていないことと樹勢が弱い特定の種および品種のみでしか研究されていなかったことが挙げられる。

カンキツ類の半数体は、これまで種子への X 線照射、葯培養および倍数体間交雑などで作出されているが、半数体の獲得率は非常に低い。バラ科果樹では半数体を獲得するために偽受精胚珠培養がよ

く用いられている (Ochatt・Zhang, 1996; Pandey ら, 1990; Zhang・Lespinasse, 1991). カンキツ類では, 偽受精胚珠培養の報告例はほとんどないが, 最近, 長澤 (1999) は軟 X 線を二倍体カンキツ品種の花粉に照射し, 偽受精胚珠培養を行うことにより, ‘晩白柚’ から 1 個体の半数体植物といくつかの半数性を示す胚様体の誘導に成功している. 一方, オオムギやコムギでは遠縁種との交雑により多くの半数体が獲得されている (Kasha・Kao, 1970; Symko, 1969). 田中 (1936) の分類では, カンキツ類が属するミカン亜科植物には 35 属が存在するのにもかかわらず, カンキツ類では遠縁種との交雑による半数体の作出は全く行われていない. 今後, カンキツ類においても偽受精胚珠培養や遠縁種との交雑による半数体の育成について検討し, 効率的な半数体作出方法を確立する必要があると思われる.

また, これまで獲得されているカンキツ類の半数体は, 種, 品種および系統が限られており, その中でもマンダリン類やカラタチなどの樹勢が比較的弱い種類に属するものが多い. それらの半数体は極めて貧弱な成長を示し, 開花結実はおろかほとんど成長しないものや獲得されてもすぐに枯死するものがほとんどであった. Germana・Chiancone (2001) は試験管内で三倍体品種である ‘オロブランコ’ の花粉をクレメンティンに授粉することにより, 多くの半数体の誘導に成功したものの, 育成過程ですべての半数体が枯死したことを報告している. また, 春崎 (1996) は, ‘宮内’ イヨカンとカラタチの小粒種子から半数体を 1 個体ずつ獲得したが, これらは極めて貧弱であったため, 発芽後すぐに枯死したことを報告している. このように, 半数体を獲得したものの, それを利用する前に枯死してしまうことが非常に多い. 一方, 本研究で用いたブンタン

品種である‘晩白柚’の半数体は、これらの半数体植物とは異なり、樹勢が極めて強く、半数体の状態で開花結実している。さらに、長澤（1999）は偽受精胚珠培養により、‘晩白柚’から1個体の半数体を獲得したが、この半数体も本研究で用いた半数体ブンタンと同様に強い樹勢を示している。おそらく、半数体の開花の原因は、遺伝子型が大きく影響するものと考えられ、ブンタン類やシトロン類のような樹勢の強い種、品種および系統を選択し、半数体を獲得することにより、半数体の状態を維持したままで開花結実に至る植物が得られるものと考えられる。

半数体の利用法として、品種としての直接利用、突然変異育種および倍加半数体育種などが挙げられるが(鶴飼, 2003), 一般的には、倍加半数体を用いた育種および遺伝解析がほとんどである (Lotfi ら, 2003 ; Qu・Hancock, 2002 ; Tosca ら, 1995). 草本性植物では、倍加半数体を用い、減数分裂における染色体行動などの細胞遺伝学的解析や耐寒性、耐乾性および耐病性などの遺伝解析が行われている。さらに、F<sub>1</sub> 育種による品種育成なども行われている (Lotfi ら, 2003 ; Qu・Hancock, 2002 ; Tosca ら, 1995). 特に、イネ、コムギおよびタバコなどでは、倍加半数体を利用して、多くの品種が作出されており、産業面に大きく貢献している (鶴飼, 2003). また、倍加半数体は DNA マーカーの利用による量的遺伝子座 (QTL) 解析の材料として好適である。近年、カンキツ類においても DNA マーカーを用いた遺伝解析が盛んに行われている (藤井ら, 2003; Kita ら, 2003 ; Shimada ら, 2003 ; 2005). 倍加半数体との交雑で得られた F<sub>1</sub> 世代を材料とし、QTL 解析を行うことで、カンキツ類における多胚性や雌雄性不稔性、自家不和合性以外に、最近注目されている  $\beta$ -

クリプトキサンチン，ノビレチン，オーラプテンなどの健康機能性成分の遺伝解析が効率的に行うことができるだろう。

また，カンキツ類では組織培養や細胞融合などの細胞工学的技術による半数体の部分ゲノムの導入が可能である．1980年代から植物バイオテクノロジーが急速に進歩し，育種法の一つとして細胞融合が行われるようになり，カンキツ類においても多くの体細胞雑種の作出例が報告されている（Grosserら，2000；Guo・Deng，2001；Takamiら，2004；2005）．特に，半数体と細胞融合を行えば，種無しや耐寒性，耐病性などの特徴ある形質が期待される三倍体が獲得することができ，さらに，直接的に品種となる可能性が非常に高く，カンキツ産業に大きく貢献できるものと考えられる．実際に，二倍体と半数体との細胞融合により三倍体が作出されており，その果実が注目されている（Kobayashiら，1997；Ollitraultら，1998）．さらに最近では，カンキツ類においてもマイクロプロトプラストを用いた部分ゲノムの導入が試みられている（Louzadaら，2002）．培養細胞や花粉母細胞にアミプロホスメチル（APM）などの分裂阻害剤を処理することにより，マイクロプロトプラストを単離することができ，二倍体との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．通常は，二倍体の細胞からの単離であるため，様々な染色体数を有するマイクロプロトプラストが誘導されるが，半数体を用いれば，その染色体数の幅が狭く，材料として非常に扱いやすい．半数体植物由来のマイクロプロトプラストと二倍体との非対称融合は，カンキツ類ではこれまでに報告例はほとんどなく，融合個体が獲得できれば，自家不和合性，単為結果性，雄性不稔性および多胚性などといった有用遺伝子の遺伝解析に利用できるものと考え

られる。

以上より，本研究ではカンキツ類の半数体植物における形態的特徴や生殖機能に関する基礎的情報を得ることができた。また，半数体ブンタンの新梢の腋芽へのコルヒチン処理を行い，倍加半数体を作出することができた。今後，本研究で得られた知見は，育種学的，遺伝学および発生学的研究において重要な資料になると考えられる。さらに，倍加半数体はカンキツ類における遺伝解析や計画育種を進めていく上で極めて重要な材料となるだろう。

## 要約

果樹などの永年作物は、雑種性が強く、播種から開花結実に至るまで長年月を要するため、遺伝解析や育種の推進が困難であり、多大の費用と圃場を要する。半数体は、その染色体を倍加することによって容易に純系個体が得られることから遺伝解析や計画育種を行う上で極めて有用と考えられる。カンキツ類における半数体は、ナツダイダイ、カラタチおよびクレメンティンなどのいくつかの種で獲得されているが、樹勢が極めて弱く、ほとんど成長しない。そのため、カンキツ類では、半数体の開花結実例はなく、生殖機能に関する情報は全くない。一方、Toolapong ら（1996）は、ブンタン品種である‘晩白柚’から雌性配偶子由来の半数体を獲得した。この半数体は、カラタチ台に高接ぎすると旺盛に成長し、発芽7年以降に初めて開花結実した。

そこで本研究では、Toolapong ら（1996）によって育成された半数体ブンタンを用い、第一に、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、葉、花、花粉および果実の形態を調査した。さらに、半数体ブンタン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と染色体観察により葉、花および果実などの様々な器官、組織の倍数性を調査した。第二に、半数体ブンタン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、半数体ブンタンと種々の二倍体カンキツ品種との交雑を行った。第三に、半数体ブンタンの雌性および雄性配偶子における減数分裂過程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。第四に、半数体ブンタンの新梢の腋芽へコルヒチン処理を行い、



遺伝解析や計画育種などに重要な材料となる倍加半数体の作出を試みた。

1. 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、半数体ブンタンにおける葉、花、花粉および果実の形態を調査した。また、半数体ブンタン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と染色体観察により葉、花および果実などの様々な器官および組織の倍数性の解析を行った。半数体ブンタンの葉、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。半数体ブンタンの花粉稔性は、‘晩白柚’のそれと比較して著しく低かったが、わずかながらに稔性が認められた。一方、果実は‘晩白柚’と比べ、1/9程度の重さであり、非常に小さくなっていった。また、種子の形成は認められなかった。次に、半数体ブンタンの葉、花および果実の各器官および組織をフローサイトメーターで解析した結果、半数体ブンタンの葉、がく片、花弁、花糸、砂じょう、アルベドおよびフラベドの相対蛍光強度が‘晩白柚’の半分となり、すべての器官および組織で半数性を示した。さらに、半数体ブンタン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本の染色体が確認された。これらの結果より、この本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。

2. 半数体ブンタンと種々の二倍体カンキツ品種との交雑を行った結果、半数体ブンタン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、半数体ブンタンを花粉親とした場合、4つの交雑組合

せで完全種子が得られた。これらの完全種子は正常に発芽し、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、半数体ブンタンの形態的特徴である翼葉を有していた。さらに、‘清見’と半数体ブンタンとの交雑から得られた 1 個体の実生について、RAPD 分析および CMA 染色による染色体構成を解析したところ、雑種であることが確認された。これらの結果から、本半数体では稔性花粉 ( $n=9$ ) が形成されていることが明らかとなった。

3. 半数体ブンタンの雄性配偶子および雌性配偶子の形成過程を観察するとともに、雄性配偶子の稔性回復機構について細胞遺伝学的解析を行った。半数体ブンタンにおける花粉母細胞の減数分裂過程を観察した結果、半数体ブンタンは連続した 2 回の分裂を行っていたものの、ほとんどの分裂細胞で減数分裂の異常が認められた。一部の分裂細胞では、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や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、両極に分裂するものが観察された。さらに、花粉四分子期において、‘晚白柚’では 99.3%が四分子であったのに対し、半数体ブンタンでは、一分子から六分子の小孢子型が観察され、二分子が 24.7%と、非常に高い頻度で出現していた。これらの結果は、半数体ブンタンの花粉が第一分裂復旧 (FDR) のような異常によって稔性が回復していることを示唆した。一方、雌性器官では、半数体ブンタンの雌ずいの中心部で花柱溝同士が癒合しており、花粉管の伸長が阻害されていた。また、半数体ブンタンの雌性配偶子形成では、胚のう母細胞が全く形成されないため、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。

4. 半数体ブンタンの新梢の腋芽にコルヒチン処理を行った結果，処理された腋芽から新たに発生した新梢の倍数性は，もとの半数体以外に，半数体と二倍体および二倍体と四倍体の細胞キメラであった．二倍体と四倍体の細胞キメラをカラタチ台に一芽接ぎしたところ，染色体数が 18 本の二倍体を得られた．この二倍体系統は半数体ブンタンと比較して旺盛な成長を示した．二倍体系統の単位面積あたりの葉重と気孔の大きさを調査したところ，半数体ブンタンより有意に重くて大きく，‘晩白柚’と同様の値を示した．さらに，RAPD 分析と CMA 染色による染色体構成の結果より，この二倍体は半数体ブンタンの倍加半数体であることが確認された．

Studies on morphological characterization of a haploid pummelo and  
its reproductive function

Masaki Yahata

Summary

Woody species such as fruit crops are generally characterized by a long reproductive cycle and a high degree of heterozygosity. For these reasons, genetic improvement using conventional methods is time-consuming and limited by the required space for field cultivation. Haploid plants are of particular interest to breeders of fruit crops because they afford the opportunity to establish homozygous plants by doubling of their chromosomes, and these plants are very useful materials for genetic analysis and strategic breeding. In *Citrus* and related species, haploid production has been reported in Natsudaidai (*C. natsudaidai* Hayata), trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* [L.] Raf.), and clementine (*C. clementina* Hort. ex Tanaka). However, these haploids were very weak, and they grew more slowly than diploid plants. Therefore, no flowering of haploids in *Citrus* species has ever been reported, and the reproductive potential has not yet been determined. On the other hand, Toolapong *et al.* (1996) selected a haploid plant derived from a female gamete of the 'Banpeiyu' pummelo (*C. grandis* Osbeck). When this haploid pummelo was grafted onto a trifoliolate orange, it showed vigorous growth and flowered for the first time seven

years after germination.

The objectives of the present study were: 1) to investigate the morphological characteristics of leaves, flowers, pollen grains, and fruit and to confirm the stability of the ploidy level of the haploid pummelo in several tissues and organs by flow cytometry and chromosome observation, 2) to evaluate the reproductive potential of female and male gametes in the haploid pummelo by crosses between the haploid and several citrus diploid cultivars, 3) to investigate female and male gamete formation of the haploid pummelo by cytogenetic analysis, and 4) to produce homozygous strains of the haploid pummelo by colchicine treatment to axillary buds of a current shoot.

#### 1. Morphological characterization of the haploid pummelo

Morphological investigations and flow cytometric analysis in the leaves, flowers, and fruits of the haploid pummelo were performed and it was found that all three were significantly smaller than those of the 'Banpeiyu' pummelo. Although the haploid pummelo had abnormal flowers, it produced slightly fertile pollen grains. The fruit of the haploid pummelo was very small, approximately 1/9 the size of those of 'Banpeiyu' pummelo. This fruit had no seed. Flow cytometric analysis revealed that the fluorescence intensity of the haploid pummelo was half that of the leaves, sepals, petals, filaments, juice sac, albedo, and flavedo of the 'Banpeiyu' pummelo. Furthermore, chromosome observation of the young leaves of several stems revealed that the chromosome number of the haploid pummelo was 9. These results

demonstrated that the ploidy level of the haploid pummelo was maintained.

## 2. Evaluation of the reproductive function in the haploid pummelo

To evaluate the reproductive potential of female and male gametes in the haploid pummelo, the crosses between the haploid pummelo and several diploid citrus cultivars were performed. In the crosses with the diploid cultivars as pollen parents, no fruit set of the haploid pummelo was observed in any of the cross combinations. However, developed seeds were obtained in four cross combinations, when some monoembryonic diploid cultivars were pollinated with pollen of the haploid pummelo. These developed seeds germinated normally, and many diploid seedlings were obtained. These seedlings grew vigorously, and all of them had large wing leaves, which is the typical morphology of the haploid pummelo. Furthermore, the hybridity of a seedling obtained from the cross between a 'Kiyomi' tangor and the haploid pummelo was confirmed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis and chromosome composition was determined by chromomycin A<sub>3</sub> (CMA) staining. These results suggest that the haploid pummelo could produce fertile pollen grains (n=9).

## 3. Abnormalities of gamete formation in the haploid pummelo

To investigate female and male gamete formation in the haploid pummelo, cytogenetic analysis during meiosis was performed. Although meiosis in the pollen mother cells of the haploid pummelo

occurred twice, abnormalities were observed in most dividing cells. In some dividing cells, no univalents were distributed to the opposite poles at anaphase I ; instead, they remained near the equatorial plate. In spite of the second meiotic division, 9 univalents ranged on the equatorial plate, and they were distributed equally in the direction of opposite poles. Furthermore, in the tetrad stage, the tetrad was 99.3% in the 'Banpeiyu' pummelo, whereas sporads of monad to hexad were observed in the haploid pummelo, and the dyad had the high frequency of 24.7%. These results suggest that any production of fertile pollen grains would be caused by the abnormalities in the first meiotic division such as the first division restitution (FDR). On the other hand, in the pistil of the haploid pummelo, elongation of the pollen tube was prevented by the adhesion of the stylar canals. No embryosac mother cell was formed among the female gametes, and a normal embryosac was not observed at any stage. The cause of female sterility in the haploid pummelo was abnormality of the stylar canals and the lack of formation of the mother embryosac.

#### 4. Production of a doubled haploid using colchicine treatment of current shoots

To produce the homozygous strain of a haploid plant derived from seedlings of 'Banpeiyu' pummelo, colchicine treatment on axillary buds of current shoots of the haploid was performed. Numerous shoots with cytochimeras ( $X+2X$  and  $2X+4X$ ) arose from colchicine-treated axillary buds. When cytochimeric buds of  $2X+4X$  were bud-grafted onto a

trifoliate orange, a diploid strain with 18 chromosomes was obtained from the cytochimera. This diploid strain showed vigorous growth compared with the original haploid pummelo. The leaf weight per unit area and the stomata size in this diploid were significantly larger than those of the haploid plant, and were almost equal to those of the 'Banpeiyu' pummelo. Furthermore, the diploid strain was confirmed to be a doubled haploid of a haploid from the 'Banpeiyu' pummelo by using RAPD analysis, and the chromosome composition was determined by CMA staining.



## 謝辞

本研究の遂行並びに本論文の作成をするにあたり，終始御懇篤なる御指導を賜った，宮崎大学農学部教授・山下研介博士，同大学農学部助教授・國武久登博士，また，本論文の校閲を賜った，鹿児島大学農学部教授・岩井純夫博士，佐賀大学農学部・田代洋丞博士，宮崎大学農学部教授・藪谷勤博士に衷心から感謝の意を表する．さらに，研究を進めるにあたり，御懇切丁寧なご指導と多大なる御助言を頂いた九州東海大学農学部教授・小松春喜博士，千葉大学園芸学部教授・三位正洋博士，河瀬技術士事務所・河瀬憲次博士，愛知教育大学教育学部助教授・加藤淳太郎博士に深く感謝の意を表する．

なお，宮崎大学農学部附属自然共生フィールド科学教育研究センター技官・黒木義一氏，宮崎県宮崎市カンキツ栽培農家・奥野安弘氏，熊本県八代市カンキツ栽培農家・春崎清登氏には，貴重な実験材料の御提供と多大なる御協力を頂いた．また，本研究の遂行にあたり宮崎大学農学部植物遺伝育種学研究室，九州東海大学農学部果樹園芸学研究室の専攻生には，身に余る御激励と御協力を頂いた．ここに記して心より感謝の意を表する．

## 引用文献

- Assani, A., F. Bakry, F. Kerbellec, R. Haicour, G. Wenzel and B. Foroughi-Wehr. 2003. Production of haploids from anther culture of banana [*Musa balbisiana* (BB)]. *Plant Cell Rep.* 21 : 511-516.
- Bajaj, Y. P. S. 1990. *In vitro* production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding, p. 1-44. In: Y. P. S. Bajaj (ed.). *Haploids in crop improvement. Biotechnology in agriculture and forestry*, Vol. 12. Springer, Berlin Heidelberg New York.
- Befu, M., A. Kitajima, Y. X. Ling and K. Hasegawa. 2000. Classification of 'Tosa-Buntan' pummelo (*Citrus grandis* [L.] Osb.), 'Washington' navel orange (*C. sinensis* [L.] Osb.) and trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* [L.] Raf.) chromosomes using young leaves. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 69 : 22-28.
- Blakeslee, A. F., F. J. Belling and M. E. Farnham. 1923. Inheritance in tetraploid daturas. *Bot. Gaz.* 76 : 329-373.
- Bonga, J. M., P. von Aderkas and D. James. 1987. Potential application of haploid culture of tree species. In : Hanover, J. M. and D. E. Keathley (eds.). *Genetic manipulation of woody plants*, pp. 57-77. Plenum Press, New York.
- Bouvier L., P. Guerif, M. Djulbic, C. E. Durel, E. Chevreau and Y. Lespinasse. 2002. Chromosome doubling of pear haploid plants and homozygosity assessment using isozyme and microsatellite markers. *Euphytica* 123 : 255-262.
- Chalak, L. and J. M. Legave. 1996. Oryzalin combined with adventitious

- regeneration for an efficient chromosome doubling of trihaploid kiwifruit. *Plant Cell Rep.* 16 : 97-100.
- Chen, Z., M. Wang and H. Liao. 1980. The induction of citrus pollen plants in artificial media. *Acta Genet. Sinica* 7 : 189-191.
- Crane, C. F., W. D. Beversdorf, and E. T. Bingham. 1982. Chromosome pairing and associations at meiosis in haploid soybean (*Glycine max*). *Can. J. Genet. Cytol.* 24 : 293-300.
- Doyle, J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19 : 11-15.
- Dweikat, I. M. and P. M. Lyrene. 1990. Twin seedlings and haploids in blueberry (*Vaccinium* spp.). *J. Hered.* 81 : 198-200.
- Esen, A. and R. K. Soost. 1971. Unexpected triploids in Citrus: The origin, identification, and possible use. *J. Hered.* 62 : 329-333.
- FAO. 2004. FAO statistical Databases <http://faostat.fao.org/>
- Foroughi-Wehr, B. and G. Wenzel. 1989. Androgenetic haploid production. *Newsl, Int. Assoc. Plant Tiss. Cult.* 58 : 11-18.
- Frost, H. B. and C. A. Krug. 1942. Diploid-tetraploid periclinal chimeras as bud variants in citrus. *Genetics* 27 : 619-634.
- 藤井 浩・島田武彦・遠藤朋子・大村三男. 2003. カンキツ EST データベースシステムの開発. *果樹研報.* 2 : 91-99.
- Fukui, K. 1996. Plant chromosome at mitosis. p.1-17. In: K. Fukui and S. Nakayama (eds.). *Plant chromosome. Laboratory methods.* CRC Press, Florida.
- Germana, M. A., Y. Y. Wang, M. G. Barbagallo, G. Iannolino and F. G. Crescimanno. 1994. Recovery of haploid and diploid plantlets from

- anther culture of *Citrus clementina* Hort. ex Tan. and *Citrus reticulata* Blanco. J. Hort. Sci. 69 : 473-480.
- Germana, M. A., G. Reforgiato and M. P. Russo. 2000. Preliminary characterization of several doubled haploids of *Citrus clementina* cv. Nules. Acta Hort. 535 : 183-190.
- Germana, M. A. and B. Chiancone. 2001. Gynogenetic haploids of *Citrus* after *in vitro* pollination with triploid pollen grains. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 66 : 59-66.
- Germana, M. A. and B. Chiancone. 2003. Improvement of *Citrus clementina* Hort. ex Tan. microspore-derived embryoid induction and regeneration. Plant Cell Rep. 22 : 181-187.
- Grosser, J. W., P. Ollitrault and O. Olivares-Fuster. 2000. Somatic hybridization in citrus: an effective tool to facilitate variety improvement. In Vitro Cell Dev. Biol. Plant 36 : 434-449.
- Guerra, M. 1993. Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. Heredity 71 : 234-241.
- Guo, W. W. and X. X. Deng. 2001. Wide somatic hybrids of *Citrus* with its related genera and their potential in genetic improvement. Euphytica 118 : 175-183.
- 春崎聖一. 1996. カンキツ類の倍数性育種に関する研究. 九州東海大学修士論文.
- 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.

- Hesse, C. O. 1971. Monoploid peaches, *Prunus persica* Batsch: description and meiotic analysis. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 96 : 326-330.
- Hidaka, T., Y. Yamada and T. Shichijo. 1979. *In vitro* differentiation of haploid plants by anther culture in *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Japan. J. Breed. 29 : 248-254.
- Hidaka, T., Y. Yamada, and T. Shichijo. 1982. Plantlet formation by anther culture in *Citrus aurantium* L. Japan. J. Breed. 32 : 247-252.
- Hidaka, T. 1984. Induction of plantlets from anthers of 'Trovia' orange (*Citrus sinensis* Osbeck). J. Japan. Soc. Hort. Sci. 53 : 1-5.
- Horfer, M. and Y. Lespinasse. 1996. Haploidy in apple, p. 261-276. In: S. M. Jain, S. K. Sopory, and R. E. Veilleux (eds). *In vitro* haploid production in higher plants, Vol 3. Kluwer, Dordrecht.
- Humphrey, L. M. 1934. The meiotic divisions of haploid, diploid, and tetraploid tomatoes with special reference to the prophase. *Cytologia* 5 : 278-300.
- 磯部 暁・松田明治・平山秀文・永田照彦. 1982. 人工授粉によるバンペイユの結実安定と品質向上に関する研究. 熊本果研報. 4 : 1-20.
- Iwamasa, M. 1966. Studies on sterility in genus citrus with special reference to the seedlessness. Bull. Hort. Res. Sta. B6 : 1-81.
- 岩政正男. 1976. 柑橘の品種. 静岡県柑橘農業協同組合連合会. 静岡.
- 岩政正男. 1999. 種子形成－花粉, 胚のうおよび胚の発達. p. 263-287. 岩堀修一・門屋一臣編. カンキツ総論. 養賢堂. 東京.

- 岩崎藤助・西浦昌男・奥代直巳. 1966. カンキツ新品種「興津早生」と「三保早生」について. 園試報. B6 : 83-93.
- Kadota, M. and Y. Niimi. 2002. *In vitro* induction of tetraploid plants from a diploid Japanese pear cultivar (*Pyrus pyrifolia* N. cv. Hosui). Plant Cell Rep. 21 : 282-286.
- Kaneko, Y., S. W. Bang, J. Torri-Abe, R. B. Eduardo and Y. Matsuzawa. 2003. Chromosome pairing in haploid plants of radish derived from alien monosomic addition lines. Plant Breed. 122 : 450-452.
- Karasawa, K. 1971. On the occurrence of haploid seedlings in *Citrus natsudaidai* Hayata. Bull. Sakushingakuin Junior College for Women 1 : 1-2.
- Kasha, K. L. and K. N. Kao. 1970. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). Nature (Lond.) 225 : 874-875.
- Kato, M., Y. Ikoma, H. Matsumoto, M. Sugiura, H. Hyodo, and M. Yano. 2004. Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. Plant Physiol. 134 : 824-837.
- Kawai, S., Y. Tomono, E. Katase, K. Ogawa, M. Nonomura-Nakano, H. Nesumi, T. Yoshida, M. Sugiura, and Yano M. 2001. Quantitative study of fruit flavonoids in citrus hybrids of King (*C. nobilis*) and Mukaku Kishu (*C. kinokuni*). J. Agric. Food Chem. 49 : 3982-3986.
- Kimber, G. and R. Riley. 1963. Haploid angiosperms. Bot. Rev. 29 : 480-531.
- Kita, M., T. Endo, T. Shimada, T. Moriguchi, Y. Hirata, S. Hasegawa, and M. Omura. 2003. Allelic structure of UDP-glucose: limonoid

glucosyltransferase affect limonoid bitterness in *Citrus unshiu* and *C. sinensis*. *Euphytica* 132 : 87-94.

Kobayashi, S., T. Ohgawara, E. Ohgawara, I. Oiyama and S. Ishii. 1988. A somatic hybrid plant obtained by protoplast fusion between navel orange (*Citrus sinensis*) and satsuma mandarin (*C. unshiu*). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 14 : 63-69.

Kobayashi, S., T. Ohgawara, K. Fujiwara and I. Oiyama. 1991. Analysis of cytoplasmic genomes in somatic hybrids between navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) and 'Murcott' tangor. *Theor. Appl. Genet.* 82 : 6-10.

Kobayashi, S., T. Ohgawara, W. Saito, Y. Nakamura and J. Shimizu. 1995. Fruit characteristics and pollen fertility of somatic hybrids. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 64 : 283-289.

Kobayashi, S., T. Ohgawara, W. Saito, Y. Nakamura and M. Omura. 1997. Production of triploid somatic hybrids in citrus. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 66 : 453-458.

Kurtar, E. S., N. Sari and K. Abak. 2002. Obtention of haploid embryos and plants through irradiated pollen technique in squash (*Cucurbita pepo* L.). *Euphytica* 127 : 335-344.

Lespinnasse, Y., L. Bouvier, M. Djulbic and E. Chevereau. 1999. Haploid apple and pear. *Acta Hort.* 484 : 49-54.

Lotfi, M., A. R. Alan, M. J. Henning, M. M. John and E. D. Earle. 2003. Production of haploid and doubled haploid plants of melon (*Cucumis melo* L.) for use in breeding for multiple virus resistance. *Plant Cell Rep.* 21 : 1121-1128.

- Louzada, E. S., H. S. del Rio, D. Xia and J. M. Moran-Mirabal. 2002. Preparation and fusion of *Citrus* sp. microprotoplast. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 127 : 484-488.
- Martin, F. W. 1958. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. Stain Technol. 34 : 125-128.
- 松本亮司・奥代直巳・生山 巖・高原利雄・山本雅史・浅田謙介・石内伝治・村田広野. 1991. カンキツ新品種 '津之香'. 果樹試報. 21 : 59-65.
- Miranda M, F. Ikeda, T. Endo, T. Moriguchi and M. Omura. 1997a. Comparative analysis on the distribution of heterochromatin in *Citrus*, *Poncirus* and *Fortunella* chromosomes. Chromosome Res. 5 : 86-92.
- Miranda M, F. Ikeda, T. Endo, T. Moriguchi and M. Omura. 1997b. Chromosome markers and alterations in mitotic cells from interspecific *Citrus* somatic hybrids analysed by fluorochrome staining. Plant Cell Rep. 16 : 807-812.
- Morinaga, T. and E. Fukushima. 1934. Cytological studies on *Oryza sativa* L. I . Studies on the haploid plant of *Oryza sativa* L. Japan. J. Bot. 7 : 73-106.
- Murashige, T. and D. P. H. Tucker. 1969. Growth factor requirement of citrus tissue culture. p.1155-1161. In: H. D. Chapman (ed.). Proc. First Int. Citrus Symp. Vol. 3. University of California, Riverside.
- 長澤幸治. 1999. カンキツ類における偽受精胚珠培養による半数体の誘導とその非対称細胞融合への利用. 九州東海大学修士論文.
- Nakano, M., H. Nesumi, T. Yoshioka and T. Yoshida. 2001. Segregation



of plants with undeveloped anthers among hybrid derived from the seed parent, 'Kiyomi' (*Citrus unshiu* × *C. sinensis*). J. Japan. Soc. Hort. Sci. 70 : 539-545.

西浦昌男・岩崎藤助・伊庭慶昭・奥代直巳・上野 勇・木原武士・山田彬雄・中谷宗一・吉田俊雄. 1972. カンキツ新品種「久能温州」と「瀬戸温州」について. 園試報. B12 : 1-13.

西浦昌男・七条虎之助・上野 勇・岩政正男・木原武士・山田彬雄・吉田俊雄・岩崎藤助. 1983. カンキツの新品種「清見」について. 果樹試報. B10 : 1-9.

Notsuka, K., T. Tsuru and M. Shiraishi. 2000. Induced polyploid grapes via *in vitro* chromosome doubling. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 69 : 543-551.

Ochatt, S. J. and Y. X. Zhang. 1996. *In vitro* haploidization of fruit trees. p.193-210. In: S. M. Jain, S. K. Sopory and R. E. Veilleux (eds.). *In vitro* haploid production in higher plants. Vol. 3. Kluwer, Dordrecht.

Ogawa, K., A. Kawasaki, T. Yoshida, H. Nesumi, M. Nakano, Y. Ikoma and M. Yano. 2000. Evaluation of auraptene content in citrus fruits and their products. J. Agric. Food Chem. 48 : 1763-1769.

Ohgawara, T., S. Kobayashi, E. Ohgawara, H. Uchiyama and S. Ishii. 1985. Somatic hybrid plants obtained by protoplast fusion between *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. Theor. Appl. Genet. 71 : 1-4.

Ohgawara, T., S. Kobayashi, S. Ishii, K. Yoshinaga and I. Oiyama. 1989. Somatic hybridization in *Citrus*: navel orange (*C. sinensis* Osb.)

- and grapefruit (*C. paradise* Macf.). Theor. Appl. Genet. 78 : 609-612.
- Oiyama, I. and S. Kobayashi. 1993. Haploids obtained from diploid × triploid cross of citrus. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 62 : 89-93.
- 奥代直巳・生山 巖・高原利雄. 1981. 多胚性カンキツ類における雑種実生獲得率の向上に関する研究. I 品種, 系統間の胚数及び雑種実生獲得率の差異について. 果樹試報. D3 : 24-34.
- Ollitrault, P., D. Dambier, Sudahono, F. Mademba-Sy, F. Vanel, F. Luro and B. Aubert. 1998. Biotechnology for triploid mandarin breeding. Fruits. 53 : 307-317.
- Pandey, K. K., L. Przywara and P. M. Sanders. 1990. Induced parthenogenesis in kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) through the use of lethally irradiated pollen. Euphytica 51 : 1-9.
- Pedrosa, A., D. Schweizer and M. Guerra. 2000. Cytological heterozygosity and the hybrid origin of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. Theor. Appl. Genet. 100 : 361-367.
- Pooler, M. and R. Scorza. 1995a. Occurrence of viable eggs in haploid peach. Fruit Var. J. 49 : 239-241.
- Pooler, M. and R. Scorza. 1995b. Aberrant transmission of RAPD markers in haploids, doubled haploids, and F<sub>1</sub> hybrids of peach: observations and speculation on causes. Sci. Hortic. 64 : 233-241.
- Qu, L. and J. F. Hancock. 2002. Pitfalls of genetic analysis using doubled-haploid backcrossed to its parent. Theor. Appl. Genet. 105 : 392-396.
- Recupero, G. R., G. Russo, and S. Recupero. 2005. New promising

*Citrus* triploid hybrid selected from crosses between monoembryonic diploid female and tetraploid male parents. HortScience 40 : 516-520.

Sangwan-Norreel, B. S., R. S. Sangwan and J. Pare. 1986. Haploidie et embryogenese provoquee *in vitro*. Bull. Soc. Bot. France, Actualites Botaniques. 133 : 7-39.

Sato, S., N. Katoh, H. Yoshida, S. Iwai and M. Hagimori. 2000. Production of doubled haploid plants of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) by pseudofertilized ovule culture. Sci. Hortic. 83 : 301-310.

Scorza, R. and M. Pooler. 1999. Growth and yield of F<sub>1</sub> hybrid peaches developed from doubled haploids. HortScience 34 : 928-931.

Shimada, T., M. Kita, T. Endo, H. Fujii, T. Ueda, T. Moriguchi, and M. Omura. 2003. Expressed Sequence Tags of ovary tissue cDNA library in *Citrus unshiu* Marc. Plant Sci. 29 : 555-560.

Shimada, T., T. Hirabayashi, T. Endo, H. Fujii, M. Kita, and M. Omura. 2005. Isolation and characterization of the somatic embryogenesis receptor-like kinase gene homologue (CitSERK1) from *Citrus unshiu* Marc. Sci. Hortic. 103 : 233-238.

Soost, R. K. and J. W. Cameron. 1980. 'Oroblanco', a triploid pummelo-grapefruit hybrid. HortScience 15 : 667-669.

Soost, R. K. and J. W. Cameron. 1985. 'Melogold', a triploid pummelo-grapefruit hybrid. HortScience 20 : 1134-1135.

Sugawara, K., T. Wakizuka, A. Oowada, T. Moriguchi and M. Omura. 2002. Histogenic identification by RAPD analysis of leaves and

fruit of newly synthesized chimeric *Citrus*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 127 : 104-107.

Sulistyaningsih, E., K. Yamashita and Y. Tashiro. 2002. Haploid induction from F<sub>1</sub> hybrids between CMS shallot with *Allium galanthum* cytoplasm and common onion by unpollinated flower culture. Euphytica 125 : 139-144.

Symko, S. 1969. Haploid barley from crosses of *Hordeum bulbosum* (2X) × *H. vulgare* (2X). Can. J. Genet. Cytol. 11: 602-608.

田中長三郎. 1936. 柑橘の研究. 養賢堂. 東京.

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 3X 1号’の育成. 園学研. 4 : 11-15.

Takami, K., A. Matsumaru, M. Yahata, H. Kunitake and H. Komatsu. 2005. Utilization of intergeneric somatic hybrids as an index discriminating taxa in the genus *Citrus* and its related species. Sex. Plant Reprod. 18 : 21-28.

Takami, K., A. Matsumaru, M. Yahata, T. Imayama, H. Kunitake and H. Komatsu. 2004. Production of intergeneric somatic hybrids between round kumquat (*Fortunella japonica* Swingle) and ‘Morita navel’ orange (*Citrus sinensis* Osbeck). Plant Cell Rep. 23 : 39-45.

Toolapong, P., H. Komatsu and M. Iwamasa. 1996. Triploids and haploid progenies derived from small seeds of ‘Banpeiyu’ pummelo, crossed with ‘Ruby Red’ grapefruit. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 65 : 255-260.

Tosca, A., R. Pandolfi, S. Citterio, A. Fasoli and S. Sgorbati. 1995.

Determination by flow cytometry of the chromosome doubling capacity of colchicine and oryzalin in gynogenetic haploids of gerbera. *Plant Cell Rep.* 14 : 455-458.

Toyama, T. K. 1974. Haploidy in peach. *HortScience* 9 : 187-188.

上野 勇・岩政正男・西浦昌男. 1967. カンキツ属および近縁属品種の胚数. 園試報. B7 : 11-21.

鵜飼保雄. 2003. 植物育種学. 交雑から遺伝子組換えまで. 東京大学出版会. 東京.

Van Duren, M., R. Morpurgo, J. Dolezel, and R. Afra. 1996. Induction and verification of autotetraploids in diploid banana (*Musa acuminata*) by *in vitro* techniques. *Euphytica* 88 : 25-34.

Veilleux, R. 1985. Diploid and polyploid gametes in crop plants: Mechanisms of formation and utilization in plant breeding. *Plant Breeding Rev.* 3 : 253-288.

Wakana, A., M. Iwamasa and S. Uemoto. 1981. Seed development in relation to ploidy of zygotic embryo and endosperm in polyembryonic citrus. *Proc. Int. Soc. Citricult.* Vol. 1 : 35-39.

Wan, Y., J. F. Petolino, and J. M. Widholm. 1989. Efficient production of doubled haploid plants through colchicine treatment of anther-derived maize callus. *Theor. Appl. Genet.* 77 : 889-892.

Wan, Y., D. R. Duncan, A. L. Rayburn, J. F. Petolino, and J. M. Widholm. 1991. The use of antimicrotubule herbicides for production of doubled haploid plants from anther-derived maize callus. *Theor. Appl. Genet.* 81 : 205-211.

Wan, Y. and J. M. Widholm. 1995. Effect of chromosome-doubling

agents on somaclonal variation in the progeny of doubled-haploids in maize. *Plant Breed.* 114 : 253-255.

Wenzel, G., F. Hoffmann, and E. Thomas. 1976. Heterozygous microspore-derived plants in rye. *Theor. Appl. Genet.* 48 : 205-208.

Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Lival, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18 : 6531-6535.

Wu, J. H. and P. Mooney. 2002. Autotetraploid tangor plant regeneration from *in vitro Citrus* somatic embryogenic callus treated with colchicine. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 70 : 99-104.

八幡昌紀・柏原夕希子・黒木宏憲・國武久登・小松春喜. 2004. ニンポウキンカンの種子からの四倍体誘導に及ぼすコルヒチンとオリザリン処理の影響. *園学研.* 3 : 11-16.

山本雅史・奥代直巳・松本亮司. 1992a. アンコール (*Citrus nobilis* × *C. deliciosa*) を種子親に用いた交雑実生におけるやくの退化の分離. *園学雑.* 60 : 785-789.

山本雅史・奥代直巳・松本亮司. 1992b. やくの退化した品種を種子親に用いたときのカンキツにおけるやくの退化の遺伝. *園学雑.* 60 : 791-797.

Yamamoto, M., R. Matsumoto, N. Okudai and Y. Yamada. 1997. Aborted anthers of *Citrus* result from gene-cytoplasmic male sterility. *Sci. Hortic.* 70 : 9-14.

山本雅史・松本亮司・故山田彬雄. 1998. カンキツ果汁と新梢のリモノイド含量の品種間差異及び両者の関係. *果樹試報.* 31:25-37.

Yamamoto, M. and S. Tominaga. 2002. Relationship between

seedlessness of Keraji (*Citrus keraji* hort. ex Tanaka) and female sterility and self-incompatibility. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 71 : 183-186.

Yamamoto, M. and S. Tominaga. 2003. High chromosomal variability of mandarins (*Citrus* spp.) revealed by CMA banding. Euphytica 129 : 267-274.

Yamamoto, M. and S. Tominaga. 2005. CMA banding pattern of chromosomes is useful for the identification of chromosome doubling in haploid citrus. Breed. Sci. 54 : 351-354.

Yamashita, K. 1978. Studies on self-incompatibility of Hyuganatsu, *Citrus tamurana* Hort. ex Tanaka. (I) Pollen behavior on stigmas and pollen tube growth in styles observed under a scanning electron microscope and a fluorescent microscope. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 47 : 188-194.

山下研介. 1980. ハッサクの自家不和合性に関する研究 (第1報). 雌ずい内における自家花粉の行動と数種の不和合性打破処理の効果について. 園学雑. 49 : 49-56.

山下研介・山口和典. 1992. 四倍体ヒュウガナツ花粉の組織学的ならびに生理学的異常. 園学雑. 60 : 845-849.

Yan, L. Y., X. Z. Zhang and G. J. Liu. 2000. Occurrence of unreduced gametes and ploidy restoration in haploid *Capsicum annuum* L. J. Hort. Sci. Biotechnol. 75 : 195-197.

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の非還元配偶子の推定. 園学雑. 71 : 538-543.

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.

Zagorcheva, L., M. Aleksandrova, and T. Kichukova. 1987. Meiosis in  
haploid of *Cucumis ficifolius* A. Rich. *Genetica i Seleksiya* 20 :  
269-271.

Zhang, Y. X. and Y. Lespinasse. 1991. Pollination with  
gamma-irradiated pollen and development of fruits, seeds and  
parthenogenetic plants in apple. *Euphytica* 54 : 101-109.