

第2章 細胞工学的手法による雄性不稔性育種素材の作出

緒言

第1章でも触れたように、やくの退化の発現に細胞質が関与しているかどうかは重要な問題である。なぜなら、細胞質は母性遺伝するので、やくの退化が細胞質-核遺伝子型雄性不稔であれば、やくの退化した交雑実生が得られる種子親が限定されてしまうからである。

現在まで、やくの退化した交雑実生はウンシュウミカン及び‘アンコール’の細胞質を持つ品種を種子親にした場合にのみ出現しており、やく退化が細胞質-核遺伝子型雄性不稔である可能性は強い。

従来、やく退化の不稔性の細胞質を持つ交配親は、‘清見’（西浦ら、1983）や第1章で用いたやくの退化した系統のように交雑により育成、選抜されてきた。今後もこの方法で不稔性の細胞質を持つ育種母本は作出できるものと考えられるが、全てウンシュウミカンまたは‘アンコール’が関与した組み合わせとなるため、育種素材の多様化という面からは若干問題が残る。

既に、カンキツでは細胞融合法によって体細胞雑種だけでなく、細胞質雑種の作出も可能である(Vardiら、1987; 1989; Saitoら、1993)ことが明らかになっている。

本章においてはこの細胞融合法を利用して、ウンシュウミカンの細胞質を果実品質が優秀で交配親としての利用価値が高いスイートオレンジの細胞質に導入し、雄性不稔性の育種素材の多様化を図った。

材料及び方法

1. 植物材料

カイネチン20mg/lを含むMT培地(Murashige・Tucker 1969)で振とう培養し継代している‘十万’ウンシュウ(*C. unshiu*)の胚起源のカルスと、カラタチに茎頂接ぎ木した‘F. N. ワシントン’ネーブルオレンジ(*C. sinensis*)の葉を材料とした。接ぎ木した植物は、16時間日長、3000luxで約2か月生育させた。なお、茎頂接ぎ木は高原ら(1986)の方法に準じ、は種後約2週間のカラタチを高さ約2cmの所で切断し、その切り口に0.5-1.0mmの芽をのせパラフィルムで覆った。

2. 細胞融合と植物体の再分化

カルスと葉肉からのプロトプラストの単離は、Kobayashiら(1988)の方法に従った。すなわち、カルスからのプロトプラストの単離に当たっては、シャーレ(60 X 15mm)中の0.3%マセロザイムR-10、0.2%セルロースオノ

ズカR-10、0.1%ドリセラゼ、1/2濃度のMT無機塩及び0.7Mマニトールを含む5mlの酵素液(pH5.7)に500mgのカルスを移し、25°Cで16時間静置した。そのプロトプラストをミラクロスで濾過し、100 X gで2分の遠心分離を3回行い、密度を 5×10^5 個/mlとした。

葉肉は0.1%ツイーン20を含む1%アンチホルミン溶液で20分間の殺菌を行い、滅菌水で3回すすいだ。その葉肉をカミソリで約2mm角に細切した後、0.6Mマニトール及びMT無機塩を含む1mMメス緩衝液(pH5.8)に1時間浸した。続いて、シャーレ(60 X 15mm)中の0.3%マセロザイムR-10、3%セルロースオノズカR-10、1/2濃度のMT無機塩及び0.7Mマニトールを含む5mlの酵素液(pH5.7)に200mgの葉肉を移し、25°Cで16時間、振とう(45回転/分)した。得られたプロトプラストをミラクロスで濾過し、110 X gで2分の遠心分離を3回行ない、密度を 1×10^6 個/mlに調整した。

電気融合は関西電子社のBE-800型に島津製作所の融合チャンパーFTC-33D5を接続して実施した。AC電圧の条件は1MHz、1250V/cm、60秒、DC電圧の条件は1250V/cmの方形パルスで100マイクロ秒、0.1秒間隔で3回とした。両者のプロトプラストを等量混合して3mlを直径60mmのプラスチックシャーレに移し、電気融合を行った。

処理したプロトプラストは、融合細胞のみが緑色胚になる選択培地である0.6Mショ糖と0.6MSea Plaqueアガロースを含むホルモンフリーのMT培地(BM培地)で、細胞の密度を 1×10^5 個/mlとしてシャーレ(60x15mm)で培養した。

プロトプラスト由来の緑色胚は、500mg/lの麦芽抽出物、40mg/lのアデニン、5%のショ糖、0.9%の寒天を含むBM培地に移植した。約1か月後、10mg/lのジベレリン、2%のショ糖、0.9%の寒天を含むBM培地に移植した。それから3か月後、緑色胚は完全な植物体に生長した。

3. 染色体の観察

生山(1981)の方法に従い、2mMの8-ヒドロキシキノリンを10°Cで20時間前処理した根端をエタノールと酢酸(3:1)の混合液に24時間浸し、ラクトプロピオンオルセインで3時間染色した。染色した根端はスライドガラス上で前述の染色液を1滴滴下し、カバーガラスをかけ、ろ紙で覆って親指で押し潰し、アルコールランプで短時間加熱して検鏡した。

4. DNA分析

全DNAはCTAB法(Rogers・Bendich, 1985)により抽出した。1 μ gのDNAを制限酵素(*SacI*, *PstI*, *HindIII*及び*PstI*)により37°Cで5時間反応させ、0.8%アガロース電気泳動を行ない、そのDNAをニトロセルロースフィルターにサザンブロッティング(Southern, 1975)した。

プローブには、イネの核rDNAであるプラスミドpRR217(Takaiwara,

1984), タバコの葉緑体DNA断片であるpTBa1(Sugiuraら, 1986)及びカブのミトコンドリアDNA断片であるP9.7, P12.4(Parmer・Shield, 1984)を用いた。これらのプローブはそれぞれ, 大野博士, 杉浦博士及びパーマー博士から譲与して頂いた。

プローブと目的DNAのハイブリダイゼーションはECL法(Amersham社)で実施した。

結 果

本試験においては, 5個の球状胚がプロトプラストから得られ, そのうち1個体が植物体まで生長した。その個体は正常に生長し(第4図), 葉の形態は葉肉の親である*C. sinensis*に似ていて翼葉が認められた。(第5図)。形成された植物体の染色体数は, 両親と同じく $2n=18$ であった(第6図)。

核rDNAの分析の結果, 得られた植物体のrDNAのフラグメントパターンは, *C. sinensis*と同様であった(第7図)。一方, 得られた植物体の葉緑体DNAは, *C. unshiu*と同じであった(第8図)。ミトコンドリアDNAの分析に2種類のプローブを用いたところ, どちらのプローブにおいてもミトコンドリアDNAは, *C. unshiu*と同一であった(第9図)。

これらの結果から, 本章で得られた植物体は, *C. sinensis*の核と*C. unshiu*の細胞質からなる細胞質雑種であることが明らかとなった。

考 察

本章で得られた細胞質雑種は, カルス由来のミトコンドリアDNAと葉肉由来の核DNAからなっていた。同様の結果は, 本章と同じ融合法を用い, *C. sudachi*+*C. aurantifolia*及び*C. sudachi*+*C. limon*の細胞質雑種を獲得したSaitoら(1993)も報告している。しかし, donor-recipient法によりカンキツと近縁属との細胞質雑種を作出したVardiら(1987, 1989)は, ミトコンドリアDNAが両親のいずれとも異なり新たなDNAが出現すること(再構成)を認めている。本章及びSaitoら(1993)においては, 調査した限りではミトコンドリアDNAの再構成は認められなかった。また, Kobayashiら(1991)は, カンキツの体細胞雑種においてはミトコンドリアDNAの再構成が起こっていないことを報告している。ミトコンドリアDNAの再構成の有無の違いは, 融合法の違いまたは融合組み合わせの違いに起因するものであろう。

次に, 本章で得られた細胞質雑種の葉緑体DNAは, カルス親と同じであった。細胞質雑種(Vardiら, 1989)及び体細胞雑種(Kobayashiら, 1991)の葉緑体DNAは, いずれもどちらか一方の親由来であると言われている。これらのことから, 本章においても細胞質雑種の葉緑体DNAは, どちらか一方の



Fig. 4. The regenerated plant (cybrid) produced by electrofusion between *Citrus unshiu* and *C. sinensis*.

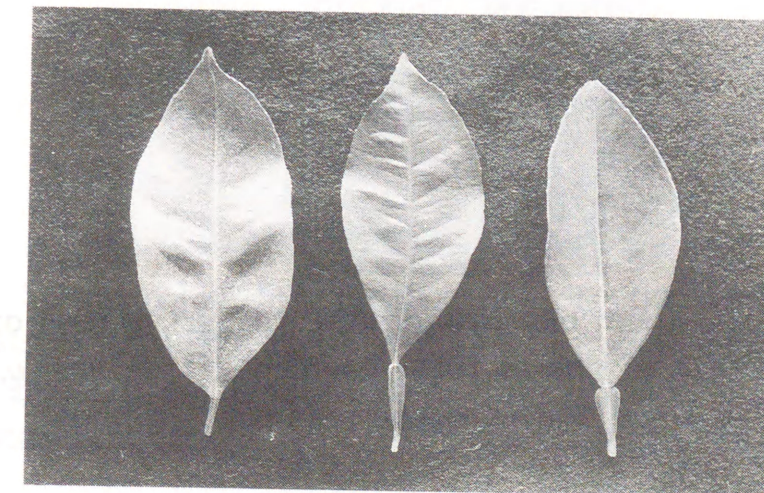


Fig. 5. Leaf morphology (from left to right) of *C. unshiu*, the regenerated plant (cybrid), *C. sinensis*.

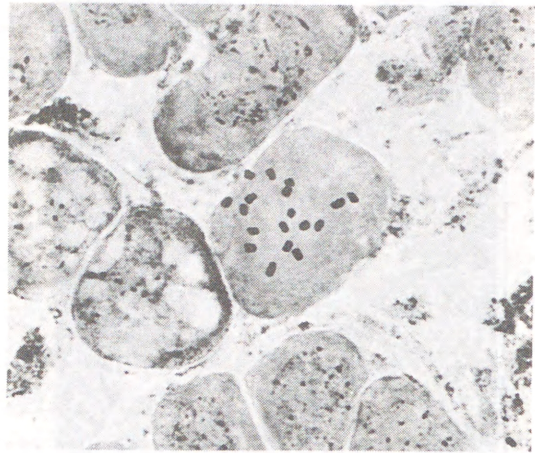


Fig. 6. Metaphase plate from the regenerated plant (cybrid) ($2n=18$).

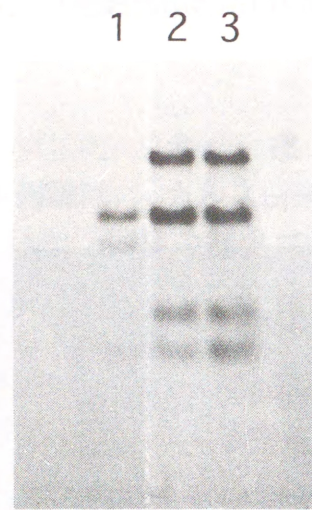


Fig. 7. Southern blot hybridization of *SadI* digests of total DNA to labelled rDNA fragments. 1: *C. unshiu*, 2: *C. sinensis*, 3: The regenerated plant (cybrid).

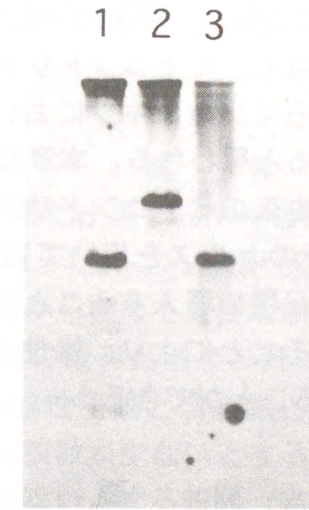


Fig. 8. Southern blot hybridization of *PstI* digests of total DNA to labelled cpDNA fragments. 1: *C. unshiu*, 2: *C. sinensis*, 3: The regenerated plant (cybrid).

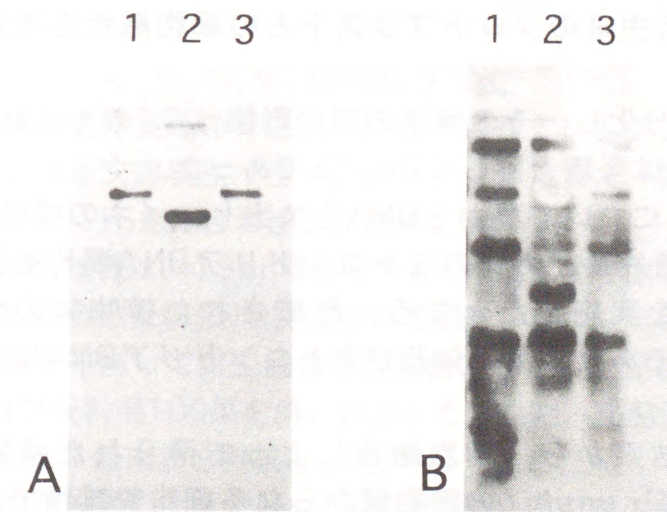


Fig. 9. Southern blot hybridization of restriction endonuclease digests of total DNA to labelled mtDNA fragments. 1: *C. unshiu*, 2: *C. sinensis*, 3: The regenerated plant (cybrid). (A) *HindIII* digested, probe P12.4, (B) *EcoRI* digested, probe P9.7.

親に由来するものと推定されたが、1個体しか得られなかった点については明らかにできなかった。

多数の作物において (Kembleら, 1980; Kadowakiら, 1986), 細胞質雄性不稔性には葉緑体DNAでなく, ミトコンドリアDNAが関与しているとする結果が得られている。おそらく, カンキツにおいても不稔性の細胞質は, ミトコンドリアDNAに存在すると思われる。本章及びSaitoら(1993)の結果から, 細胞質雑種は, カルス由来のミトコンドリアDNAを持つことから, 本章のようにウンシュウミカンのカルスを用いて細胞質雑種を作出することで, 不稔性の細胞質を多数の品種に導入することが可能となった。今後, この方法で細胞質雑種を作出することにより, 雄性不稔性を利用した無核性品種の育成をより一層推進させることができる。

摘 要

カンキツにおけるやくの退化の発現は, 細胞質が関与している可能性が強い。そこで, 不稔性の細胞質を持つと考えられるウンシュウミカンの細胞質を果実品質の優秀なスイートオレンジの細胞質に導入するため, ‘十万’ウンシュウ(*Citrus unshiu*)の胚起源のカルスから得られたプロトプラストとF. N. ‘ワシントン’ネーブルオレンジ(*C. sinensis*)の葉肉由来のプロトプラストとの細胞融合を電気融合法により行った。

1. 1個体が再分化し, その個体の葉の形態は*C. sinensis*に似通っており, 染色体数は両親と同じく $2n=18$ であった。

2. その植物体について葉からDNAを抽出し, イネの核rDNA, タバコの葉緑体DNA断片及びカブのミトコンドリアDNA断片を用い, サザンブロット分析を実施したところ, 形成された植物体のrDNAは*C. sinensis*と同一であり, 葉緑体及びミトコンドリアDNAは*C. unshiu*のもと同じであった。

3. これらの結果から, 細胞融合によって得られた植物体は, *C. sinensis*の核と*C. unshiu*の細胞質からなる細胞質雑種であることが明らかとなった。

第3章 交雑実生群の含核数

第1節 交配親と交雑実生群の含核数及び実生個体の花粉量と含核数との関係

緒 言

第1章の結果, 交雑実生群に出現するやくの退化した個体の割合を, ある程度推定することが可能となった。これは雄性不稔性を利用した無核性品種の育成を進展させるという点から極めて重要な知見である。

雄性不稔性による無核性の既存品種及び育成品種が存在するにもかかわらず, 交雑実生群における雄性不稔と含核数との関係にはなお不明な点が多く, 雄性不稔個体の方が含核数が少ないとする報告 (奥代ら, 1982) と, 雄性不稔と含核数には関係がないとする報告 (吉田, 1982) の両者がある。また, 交雑実生の含核数は, その個体の花粉量 (雄性不稔性の程度) だけでなく交配親の影響を受けることがわかっているが (吉田・花折, 1990), 詳しいことは以前として不明である。

そこで, 本節においてはカンキツ交雑実生群を供試し, 交配親と交雑実生の含核数及び実生個体の花粉量と含核数との関係について検討した。

材料及び方法

果樹試験場口之津支場の育種圃場に栽植されているウンシュウミカンを中間台とした高接ぎ交雑実生 (但し, クレメンティン×‘林温州’の組み合わせのみ自根実生) 15組み合わせ237個体を供試した。

交雑実生の含核数は, 1988年から1990年にかけて開花期に特別の処理を実施しなかった自然受粉果10果について調査した。3年の反復調査を原則とし, 各年の値を平均して実生個体の含核数とした。交配親の平均含核数は, 1990年に自然受粉果100果を用い調査した。なお, 交配親及び交雑実生ともに, 平均含核数1個未満を無核とした。

交雑実生の花粉量については, 1988年及び1990年の開花期に調査した。第1章第2節における評価法を少し変更し, 花粉:無 (雄性不稔:‘清見’, ウンシュウミカン程度), 花粉量:少 (‘アンコール’, クレメンティン程度), 中・多 (‘宮内伊予柑’, ハッサク程度) の3段階で評価した。調査は, 開花盛期のやくの裂開が盛んな晴天日の午後の実施した。単年の調査を原則としたが, 花粉の形成が不明瞭な個体については2年調査した。

結 果

第10表に交配親の含核数を示した。ウンシュウミカンの3系統 (‘林温

Table 10. Citrus cultivars used as parents and their number of seeds per fruit.

Cultivar	Latin name (Cross combination)	Number of seeds per fruit ²
Clementine	<i>Citrus clementina</i> Hort. ex Tanaka	7.3±0.5
Ellendale Hearn	Parentage unknown, possibly tangor	11.4±0.9
Encore	<i>C. nobilis</i> `King' X <i>C. deliciosa</i> `Willowleaf'	15.4±0.7
Fukuhara	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	6.6±0.3
Hassaku	<i>C. hassaku</i> Hort. ex Tanaka	11.3±1.6
Hyuganatsu	<i>C. tamurana</i> Hort ex. Tanaka	20.9±1.4
Kawachi bankan	<i>C. kawachiensis</i> Hort. ex Y. Tanaka	21.0±1.7
Kiyomi	<i>C. unshiu</i> `Miyagawa wase' X <i>C. sinensis</i> `Trovia'	2.7±0.6
Minneola	<i>C. grandis</i> `Duncan' X <i>C. tangerina</i> `Dancy'	10.8±1.1
Miyauchi iyokan	<i>C. iyo</i> Hort ex. Tanaka	4.5±0.4
Nakano No. 3 ponkan	<i>C. reticulata</i> Blanco	4.2±0.2
Seminole	<i>C. paradisi</i> `Duncan' X <i>C. tangerina</i> `Dancy'	14.9±0.9
Hayashi unshiu	<i>C. unshiu</i> Marc.	0.2±0.1
Imamura unshiu	<i>C. unshiu</i> Marc.	0.1±0.1
Okitsu wase	<i>C. unshiu</i> Marc.	0.0±0.0

² Average of 100 open pollinated fruits.

州', '今村温州' 及び '興津早生') は無核 (0.0- 0.2個) であった。'清見' (2.7個), '宮内伊予柑' (4.5個) 及び '中野 3号ポンカン' (4.2個) の含核数も少なかった。その他の品種の含核数は5個以上で, なかでもヒュウガナツ (20.9個) 及びカワチバンカン (21.0個) の含核数は多かった。

両親の平均含核数を独立変数 (x), 交雑実生の含核数の平均値をその関数 (y) としたときの回帰式は, $y=0.761x-0.370$ であり, 両者の間には, 有意な正の相関 ($r=0.772^{**}$) が認められた (第10図)。

両親の平均含核数と交雑実生における無核個体の出現率について検討した結果を第11図に示した。交雑実生における無核個体の出現率はアークサイン変換した後, 回帰式及び相関係数を算出した。両親の平均含核数を独立変数 (x), 交雑実生における無核個体の出現率のアークサイン変換値をその関数 (y) としたときの回帰式は, $y=-3.15x+56.0$ であり, 両者の間には有意な負の相関 ($r=-0.687^{**}$) が認められた。

次に, 交雑実生の花粉量と平均含核数との関係を, 組み合わせごとに検討した (第11表)。花粉量の程度が同じでも組み合わせが異なれば, 実生の平

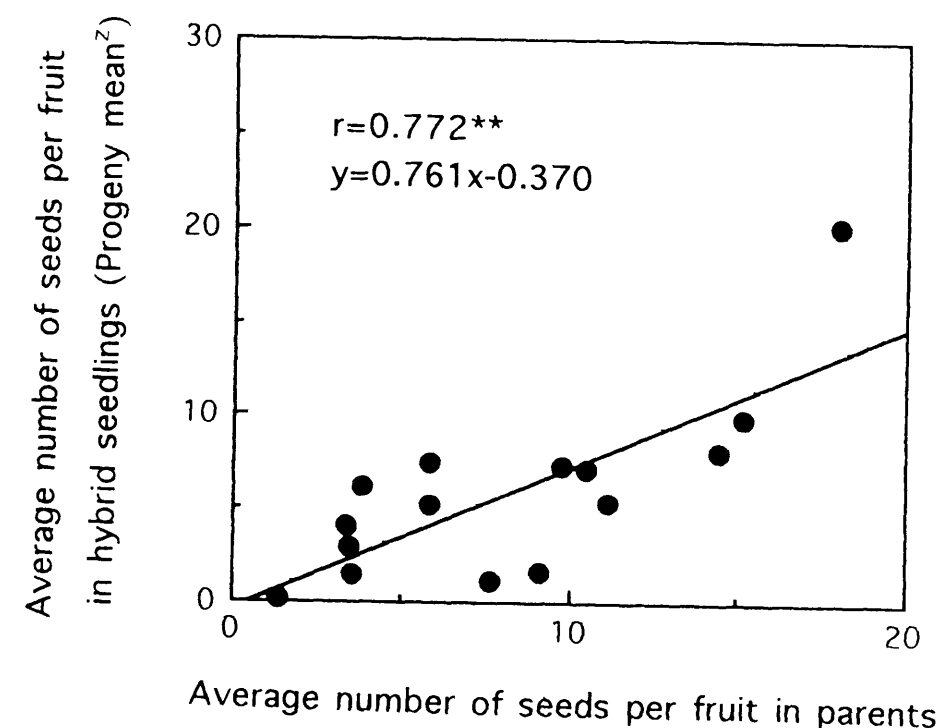


Fig. 10. The relationship in number of seeds per fruit between parents and their hybrid seedlings of citrus.

² Progeny mean is average of average number of seed per fruit of hybrid seedlings within the same cross combination.

均含核数は異なった。組み合わせ別の平均含核数は, 雄性不稔の実生で0.2- 6.2個, 花粉量が少の実生で1.4- 21.8個, 花粉量の中及び多の実生で4.5- 18.6個の範囲に分布した。同一組み合わせで生じた実生の中では, 花粉を形成する実生に比べて雄性不稔の実生の方が, 平均含核数は少ない傾向が認められた。花粉量が少と中及び多の組み合わせで生じた実生の平均含核数を比較した場合, 花粉量の少の方が平均含核数がやや多い組み合わせ (クレメンティン x '林温州', カワチバンカン x 'セミノール') もあったが, ハッサク x 'ミネオラ' 及びヒュウガナツ x '今村温州' では, 花粉量の少ない組み合わせの実生の平均含核数が少なかった。

また, 雄性不稔と花粉形成が分離した7組み合わせ (クレメンティン x '林温州', 'エレンデル ハーン' x '林温州', 'アンコール' x '興津早生', 'アンコール' x 'セミノール', '林温州' x '福原オレンジ', '清見' x 'アンコール' 及び '清見' x '興津早生') の実生群を用い, 雄性不稔の実生と花粉を形成する実生の含核数に差があるかを, 対をなす試料の t 検定を行い検討した。両者の含核数の平均値に差がないという

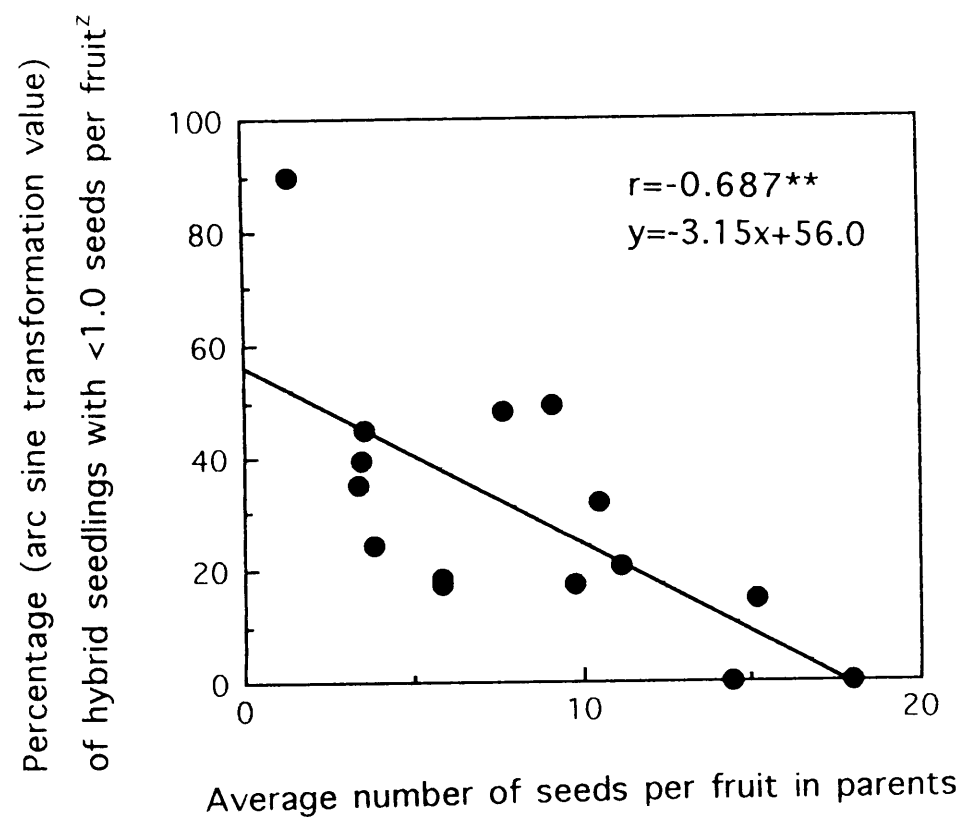


Fig. 11. The relationship between the average number of seeds per fruit of parents and the percentage of seedless hybrid seedlings (average number of seeds per fruit is less than 1.0) of citrus.

^z The percentage of seedlings of which number of seeds per fruit is less than 1.0 was calculated. Then, the percentage was converted into arc sine transformation value.

Table 11. Average number of seeds per fruit in hybrid seedlings of citrus according to pollen yield.

Cross combination	No. of seedlings	Pollen producing capacity		
		0 ^z	1 ^z	2 ^z
Average number of seeds per fruit				
Clementine X Hayashi unshiu	30	1.6(3) ^y	6.8(25)	4.5(2)
Clementine X Nakano No. 3 ponkan	10	-	7.4(10)	-
Ellendale Hearn X Hayashi unshiu	11	4.8(2)	5.3(9)	-
Encore X Ellendale Hearn	13	-	8.1(13)	-
Encore X Okitsu wase	9	0.5(5)	1.8(4)	-
Encore X Nakano No. 3 ponkan	33	-	7.3(33)	-
Encore X Seminole	16	6.2(4)	11.2(12)	-
Hassaku X Minneola	8	-	3.0(2)	6.1(6)
Hyuganatsu X Imamura unshiu	18	-	1.4(4)	8.5(14)
Hayashi unshiu X Fukuhara	30	3.1(7)	4.6(23)	-
Kawachi bankan X Seminole	10	-	21.8(7)	18.6(3)
Kiyomi X Encore	14	0.7(7)	2.7(7)	-
Kiyomi X Miyauchi iyokan	12	0.6(5)	1.9(7)	-
Kiyomi X Okitsu wase	8	0.2(8)	-	-
Kiyomi X Nakano No. 3 ponkan	15	-	3.0(15)	-

^z 0: male sterile, 1: poor yield of pollen grains, 2: medium to large yield of pollen grains.

^y Number in the parentheses indicates the number of hybrid seedlings involved.

帰無仮説のもとに t 検定を実施したところ、「P: 0.02-0.01」という結果が得られ、両者の含核数には有意な差が認められた。

花粉量と無核個体の出現率との関係においても、組み合わせが異なれば、花粉量の程度が同じでも無核個体の出現率が異なった。無核個体の出現率の範囲は、雄性不稔の実生で0.0-100.0%、花粉量が少の実生で0.0-75.0%、花粉量が中及び多で0.0-50.0%であった。この関係においても、「エレンデル・ハーン」×「林温州」を除くと、同一組み合わせにおいては、雄性不稔実生の無核個体の出現率が花粉を形成する個体のそれよりは高かった（第12表）。花粉量と平均含核数との関係と同様に、雄性不稔の実生と花粉を形成する実生における無核個体の出現率に差がないという帰無仮説のもとに t 検定を行ったところ、「P: 0.05-0.02」という結果が得られ、両者における無核個体の出現率には有意な差が認められた。

Table 12. Percentage of seedless hybrid seedlings (average number of seed per fruit is less than 1.0) in citrus according to pollen yield.

Cross combination	No. of seedlings	Pollen producing capacity		
		0 ^z	1 ^z	2 ^z
Total seedlings () and percentage of seedless one per pollen category ^x				
Clementine X Hayashi unshiu	30	33.3(3) ^y	12.0(25)	50.0(2)
Clementine X Nakano No. 3 ponkan	10	-	10.0(10)	-
Ellendale Hearn X Hayashi unshiu	11	0.0(2)	11.1(9)	-
Encore X Ellendale Hearn	13	-	0.0(13)	-
Encore X Okitsu wase	9	80.0(5)	25.0(4)	-
Encore X Nakano No. 3 ponkan	33	-	9.1(33)	-
Encore X Seminole	16	25.0(4)	0.0(12)	-
Hassaku X Minneola	8	-	0.0(2)	16.7(6)
Hyuganatsu X Imamura unshiu	18	-	75.0(4)	7.1(14)
Hayashi unshiu X Fukuhara	30	42.9(7)	30.4(23)	-
Kawachi bankan X Seminole	10	-	0.0(7)	0.0(3)
Kiyomi X Encore	14	71.4(7)	42.9(7)	-
Kiyomi X Miyauchi iyokan	12	60.0(5)	42.9(7)	-
Kiyomi X Okitsu wase	8	100.0(8)	-	-
Kiyomi X Nakano No. 3 ponkan	15	-	40.0(15)	-

^z 0: male sterile, 1: poor yield of pollen grains, 2: medium to large yield of pollen grains.

^y Number in the parentheses indicates the number of hybrid seedlings involved.

^x For example, in line 1, there are 30 seedlings. Of the 3 male sterile seedlings (0), One or 33.3% was seedless; the other two were seeded. Of the 25 seedlings which were pollen yield producers (1), 3 or 12.0% were seedless, the rest seeded; of the 2 seedlings which produced an abundance of pollen (2), one or 50.0% was seedless, the other seeded.

考 察

カンキツにおいては、含核数は果実の食べやすさや、加工適性に関する重要な形質である。そのため、栽培面からは、既存の有核性品種の含核数の減少を図るための研究が実施されており (Feinsteinら, 1975; Yamashita, 1976; 高原ら 1982; 近泉ら, 1987), 新品種の育成に際しても、無核性は重要な育種目標となっている。このように、含核数は重要な形質であるにもかかわらず、その遺伝については不明な点が多かった。

これまでもカンキツ交雑実生群の含核数を扱った報告はあった (吉田, 1982; 奥代ら, 1982; Vardi・Spiegel-Roy, 1988; 吉田・花折, 1990) が、これらはいずれも、ウンシュウミカンやウンシュウミカンを片親とする‘清見’及び‘スイートスプリング’といった無核性もしくは少核性品種を交配親に用いており、しかも扱う個体数が少ないなど遺伝様式の解明には不都合な点が多かった。

本報告においても扱った実生数が15組み合わせ237個体と、遺伝様式の検討には十分とはいえないが、供試した交配親には、含核数の少ない品種から多い品種までを含んでおり、交配親の含核数とその実生の含核数との関係がある程度明らかにすることができた。

含核数は遺伝的には雄性及び雌性器官の不稔、自家不和合性や単為結果性の程度に支配されており (Iwamasa, 1966), 圃場条件下では受粉樹や花粉を媒介する昆虫の有無にも影響される形質である。厳密に含核数の遺伝を検討するためには、環境条件を均一にし、含核数を支配する各要因について検討する必要がある。本節では自然受粉果での検討であるにもかかわらず、両親の平均含核数と実生の平均含核数との間には $r=0.772^{**}$ の相関係数が認められた。このことから、交雑育種を実施する際に、両親の平均含核数からその実生集団の平均含核数がある程度予測できることがわかった。

また、両親の平均含核数と実生集団における無核個体の出現率のアークサイン変換値との関係には $r=-0.687^{**}$ の相関関係が認められた。実生における無核個体の出現率のアークサイン変換値を回帰式 ($y=-3.15x+56.0$) から算出し、その値を無核個体の出現率に再度変換すると、両親の平均含核数が0個の場合には無核個体が7割程度出現し、両親の平均含核数が10個程度で無核個体は約2割となり、両親の平均含核数が20個以上になると無核個体は出現しないと考えられた。

以上のように、実生の含核数は交配親の含核数に影響されており、交雑実生全体で雄性不稔の実生と花粉を形成する実生の含核数を比較すると、実生個体の含核数は、花粉形成の程度だけでなく交配親の含核数にも影響されてしまい、含核数に対する雄性不稔 (花粉量) の影響が交配親の含核数の影響によって不明瞭になる可能性がある。そこで交雑実生における花粉量と含核

数の関係については各組み合わせごとに検討した。

その結果、組み合わせが同じであれば雄性不稔の実生の含核数が花粉を形成する実生の含核数より少ないことが明らかになった。既に、雄性不稔と含核数との関係について検討した報告はある（奥代ら, 1982; 吉田, 1982; 吉田・花折, 1990）が、これらにおいて雄性不稔と含核数との関係に一定の傾向を見出だせなかったのは、交配親の含核数に留意せず、しかも実生を組み合わせ別に分けて検討することをしなかったためと推察できた。

また、1組み合わせを除いた全ての組み合わせにおいて、雄性不稔の実生の方が花粉を形成する実生より、無核個体の出現率が高かった。これらは、カンキツにおける無核性育種を進めていくうえで、雄性不稔性の利用が有効であることを示している。

しかしながら、供試した交雑実生集団全体を概観すると、雄性不稔であっても含核数の多い実生や、花粉を形成するにもかかわらず無核の実生もみうけられた。同様の結果は、ウンシュウミカン雑種を調査した吉田・花折（1990）も認めている。これらのことから、雄性不稔性だけでなく、雌性不稔性及び単為結果性も無核性の発現に重要な役割を占めていることが考えられた。

本節では実生の花粉稔性及び自家不和合性の調査は実施しなかったが、カンキツにおいては花粉稔性の高い交配親からも花粉稔性が10%以下の実生が出現し（上野, 1986）、ヒュウガナツ（三輪, 1951）をはじめとする自家不和合性品種同士の交雑からも自家不和合性の実生が出現する（Soost, 1965）。しかし、本節で供試した組み合わせにおいてはその可能性は低い。今回花粉を形成しても無核であった個体については、花粉稔性が低いことや自家不和合性により無核となった実生が存在した可能性もあるので、厳密な意味では花粉稔性及び自家不和合性の調査が必要であろう。

本報告の結果、カンキツ交雑実生群の含核数は、交配親の含核数の影響下にあり、組み合わせが同じであれば、雄性不稔の実生の含核数は花粉を形成する実生に比べ少ない傾向にあることが明らかになった。無核性品種の育成を図るためには、できるだけ含核数の少ない品種を交配親に用いる必要があるが、無核性の品種を交配親とすると種子の獲得が困難なことが多い（西浦・岩崎, 1963）ので、組み合わせ当たりの交配花数を多くする必要がある。更に、第1章第2節で示したように雄性不稔（やくの退化）の実生はやくの退化した品種を種子親にしたときに最も多く出現するので、やくの退化した品種を種子親に用いることも無核性個体を効率的に獲得することに有効である。

なお、高接ぎ実生と自根実生との違いは、花粉量及び含核数に影響を及ぼすとは考えらず、また、それらに関する報告もないので、上記の研究成果は

交配親の相違によるものと判断した。

摘 要

カンキツ交雑実生15組み合わせ237個体を供試し、交配親と交雑実生群との含核数との関係、実生個体の花粉量（雄性不稔性の程度）と含核数との関係について調査した。

1. 両親の平均含核数と交雑実生の含核数との間には、有意な正の相関 ($r=0.772^{**}$) が得られた。また、両親の平均含核数と交雑実生における無核個体（平均含核数：1個未満）の出現率との間には有意な負の相関 ($r=-0.687^{**}$) が認められた。

2. 花粉量の程度が同じでも組み合わせが異なれば、実生の平均含核数は異なったが、同一組み合わせで生じた実生の中では、花粉を形成する実生に比べて雄性不稔の実生の方が、平均含核数が少ない傾向が認められた。花粉量と無核個体の出現率との関係も組み合わせが異なれば、花粉量の程度が同じでも無核個体の出現率が異なった。この関係においても、同一組み合わせで生じた実生の中では、1組み合わせを除くと、無核個体の出現率は、雄性不稔の実生の方が花粉を形成する実生より高かった。

第2節 含核数の遺伝

緒 言

カンキツの育種を効率的に実施するうえで、果実諸形質の遺伝様式の解明は、極めて重要である。カンキツにおいては、結実までに長年月を要するうえに、多胚性の品種が多く交雑実生が得にくいことなどが原因して、果実形質の遺伝様式の解明は遅れていた。ようやく最近になって果汁成分等、一部の果実形質について遺伝様式の検討が加えられ始めた (Cameron・Soost, 1977; 根角ら, 1990; 山本ら, 1990; 1991; 松本・奥代, 1991)。

しかし、無核性は重要な育種目標であるにもかかわらず、通常の二倍体レベルでの含核数の遺伝に関する研究はなかった。本章第1節において、含核数について交配親とその交雑実生との間に密接な関係があることを明らかにしたが、供試した実生数が200余りで含核数の遺伝様式を十分に解明することはできなかった。

本節では、果樹試験場口之津支場で実施しているカンキツの新品種育成のための多数の交配実生を用いて、含核数の遺伝様式を検討した。

材料及び方法

1975年から1991年にかけて、果樹試験場口之津支場育種圃場に栽植されている、自根実生樹とウンシュウミカンを中間台とした高接ぎ樹から成るカンキツ交雑実生76組み合わせ、計1,371個体の含核数を調査した。なお、調査した果実は、全て開花期に特別の処理をしていない自然受粉果であり、調査年次も各個体によって異なっていた。そのため、データには環境変異及び年次変異が含まれている。また、正逆交雑が2種類 (ハッサク×キヌカワとキヌカワ×ハッサク及び‘平戸文旦’×キヌカワとキヌカワ×‘平戸文旦’) あったが、 χ^2 均一性テストにより実生での含核数の分離には差がないと認められたので、これらについては区別せず1組み合わせとみなした。

当支場における育種調査では、含核数の程度を1果ずつについて、無：含核数0個、少：含核数1-5個、中：含核数6-9個及び多：含核数10個以上、の4段階で評価したのち、各個体の無核果の出現率を算出している。そのため、実生の正確な含核数は不明なので、本報告においては実生及び交配親の含核数を、次の4段階で評価した。無 (無核)：無核果率80%以上、少 (少核)：無核果率80%未満で含核数5個以下、中：含核数6-9個、多：含核数10個以上である。1個体につき3-10の果実を1-5年調査した。複数年調査したものは、平均値をその実生の含核数及び無核果率とした。なお、交配親の含核数は、1990年12月に自然受粉果30果を調査して求めた。

結 果

第13表に交配親40品種 (系統を含む) の含核数を示した。含核数が無に7品種、少に12品種、中に6品種、多に15品種が区分された。

交雑実生における含核数の分離について、交配親の含核数との関係で検討した (第14表)。無×少、少×少及び少×中では、含核数が無の実生の割合が最も多く、それぞれ43.7%、50.0%及び38.0%であり、次に少、中、多の順にそれに分類される個体数が少なくなった。無×中及び無×多では、含核数少の個体が最も多く、それぞれ46.2%、41.7%で、無と中がそれに次ぎ、多の個体が最も少なかった。一方、少×多、中×多及び多×多では含核数中の個体が最も多く、それぞれ38.1%、38.1%及び46.5%であった。少×多では含核数少の個体の出現も多く34.4%であったが、中×多及び多×多と、交配親の含核数が多くなると含核数多の個体の出現が、それぞれ33.3%及び32.3%と多くなり、無の個体は各2.4%しか出現しなかった。

次に、交配親の平均含核数と交雑実生における無核の個体の出現率との関係について第12図に示した。更に、親の平均含核数と交雑実生における無核及び少核の個体の出現率との関係について第13図に示した。なお、第12図の無核又は第13図の無核及び少核の交雑実生の出現率はアークサイン変換したのち、それらと親の平均含核数との間の相関係数及び回帰式を算出した。

含核数の多い親同士の組み合わせほど、無核の実生の出現率が低くなった。親の平均含核数 (x) とそれぞれの組み合わせにおける無核の実生の出現率 (y) の回帰式は $y = -1.20x + 35.0$ であり、両者の相関係数は $r = -0.574^{**}$ であった。また、親の平均含核数が比較的少なくても、無核の実生が全く出現しない組み合わせが存在した。

無核及び少核の実生の出現率も親の平均含核数が多くなると減少した。親の平均含核数 (x) とそれぞれの組み合わせにおける無核及び少核の実生の出現率 (y) の回帰式は、 $y = -1.69x + 66.8$ であり、両者の相関係数は $r = -0.675^{**}$ であった。

考 察

二倍体のカンキツにおける無核性の発現は、生殖器官の不稔、自家不和合性、胚の早期致死等による種子形成の阻害に起因する (岩政, 1978)。本節で供試した無核及び少核性の交配親のうち、ウンシュウミカンはタペート細胞の異常など数種の雄性不稔性 (Osawa, 1912; Yang・Nakagawa, 1969a; 1969b) と雌性不稔性 (三木, 1923) により無核となる。‘バレンシアオレンジ’の少核性は、染色体の相互転座を原因とし (Iwamasa, 1966)、『マーシュグレープフルーツ’は紡錘糸が形成されないことで少核となる (Raghuvanshi, 1962)。育成品種の‘清見’は、やくの退化が少

Table 13. Number of seeds per fruit and percentage of seedless fruits in parental varieties.

Type ^z	Cultivar (Latin name or Cross combination)	Number of seeds per fruit ^y	Percentage of seedless fruits ^y
Seedless			
	Hayashi unshiu (<i>Citrus unshiu</i> Marc.)	0.1±0.0	86.7
	Imamura unshiu (<i>C. unshiu</i> Marc.)	0.2±0.1	90.0
	Okitsu wase (<i>C. unshiu</i> Marc.)	0.0±0.0	100.0
	Ariake (<i>C. sinensis</i> `Seike navel' X <i>C. clementina</i> `clementine')	0.1±0.1	93.3
	K.O-14 ((<i>C. unshiu</i> X <i>C. sinensis</i>) X <i>C. unshiu</i> `Okitsu wase')	0.1±0.1	93.3
	K.O-21 ((<i>C. unshiu</i> X <i>C. sinensis</i>) X <i>C. unshiu</i> `Okitsu wase')	0.2±0.2	96.7
	T-131 (<i>C. unshiu</i> `Miho wase' X <i>C. clementina</i> `clementine')	0.0±0.0	100.0
Few seeds			
	Kiyomi (<i>C. unshiu</i> `Miyagawa wase' X <i>C. sinensis</i> `Trovita')	1.1±0.4	56.7
	Marsh (<i>C. paradisi</i> Macf.)	3.3±0.4	13.3
	Miyauhi iyokan (<i>C. iyo</i> Hort. ex Tanaka)	4.2±0.5	16.7
	Nakano No. 3 ponkan (<i>C. reticulata</i> Blanco)	4.2±0.3	0.0
	Page ((<i>C. paradisi</i> X <i>C. tangerina</i>) X <i>C. clementina</i> `Clementine')	2.2±0.5	56.7
	Robinson (<i>C. clementina</i> `Clementine' X (<i>C. paradisi</i> X <i>C. tangerina</i>))	3.5±0.7	40.0
	Valencia (<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck)	1.5±0.2	30.0
	K-4 (<i>C. unshiu</i> `Hayashi unshiu' X <i>C. clementina</i> `clementine')	0.6±0.3	76.7
	K-14 ((<i>C. nobilis</i> X <i>C. deliciosa</i>) X (<i>C. reticulata</i> `Nakano No. 3))	4.5±1.3	36.7
	E.O-21 ((<i>C. nobilis</i> X <i>C. deliciosa</i>) X <i>C. unshiu</i> `Okitsu wase')	0.6±0.2	66.7
	H.F-9 (<i>C. unshiu</i> `Hayashi unshiu' X <i>C. sinensis</i> `Fukuhara')	0.8±0.2	56.7
	No. 2700 ((<i>C. unshiu</i> X <i>C. sinensis</i>) X <i>C. sinensis</i> `Trovita')	1.2±0.3	53.3

^z Seedless: percentage of seedless fruits: 80-100%, Few seeds; percentage of seedless fruits: 0-80% and number of seeds per fruit: 0-5, Seedy; Number of seeds per fruit: 6-9, Very seedy: Number of seeds per fruit: over 10.

^y Average of 30 open pollinated fruits.

Table 13. Continued.

Type ^z	Cultivar (Latin name or Cross combination)	Number of seeds per fruit ^y	Percentage of seedless fruits ^y
Seedy			
	Clementine (<i>C. clementina</i> Hort. ex. Tanaka)	8.0±0.8	0.0
	Fukuhara (<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck)	6.3±0.5	0.0
	Orlando (<i>C. paradisi</i> `Duncan' X <i>C. tangerina</i> `Dancy')	9.5±0.9	0.0
	Ootani iyokan (<i>C. iyo</i> Hort. ex Tanaka)	6.1±0.7	10.0
	Sweet spring (<i>C. unshiu</i> `Ueda unshiu' x <i>C. Hassaku</i> `Hassaku')	8.3±0.8	0.0
	Trovita (<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck)	8.7±0.7	0.0
Very seedy			
	Ellendale Hearne (possibly tangor)	10.3±1.2	10.0
	Encore (<i>C. nobilis</i> `King' X <i>C. deliciosa</i> `Willoleaf')	16.0±1.0	16.7
	Fairchild (<i>C. clementina</i> `Clementine' X (<i>C. paradisi</i> X <i>C. tangerina</i>))	12.0±1.3	0.0
	Funadoko (<i>C. funadoko</i> Hort. ex Y. Tanaka)	13.6±0.9	0.0
	Hassaku (<i>C. hassaku</i> Hort. ex Tanaka)	18.0±2.7	0.0
	Hiradobuntan (<i>C. grandis</i> Osbeck)	62.0±5.3	10.0
	Hyuganatsu (<i>C. tamurana</i> Hort. ex tanaka)	20.9±1.2	0.0
	Iyo (<i>C. iyo</i> Hort. ex Tanaka)	13.0±1.1	0.0
	Kawachi bankan (<i>C. kawachiensis</i> Hort. ex Y. Tanaka)	22.9±2.3	3.3
	Kinukawa (<i>C. glaberrima</i> Hort. ex Tanaka)	18.1±1.4	0.0
	Minneola (<i>C. paradisi</i> `Duncan' X <i>C. tangerina</i> `Dancy')	10.1±1.4	16.7
	Murcott (possibly tangor)	12.6±0.6	0.0
	Naruto (<i>C. medioglobosa</i> Hort. ex Tanaka)	23.4±0.9	0.0
	Seminole (<i>C. paradisi</i> `Duncan' X <i>C. tangerina</i> `Dancy')	14.5±1.3	0.0
	Tosabuntan (<i>C. otachibana</i> Hort. ex Y. Tanaka)	50.3±3.6	0.0

^z Seedless: percentage of seedless fruits: 80-100%, Few seeds; percentage of seedless fruits: 0-80% and number of seeds per fruit: 0-5, Seedy; Number of seeds per fruit: 6-9, Very seedy: Number of seeds per fruit: over 10.

^y Average of 30 open pollinated fruits.

Table 14. Segregation of number of seeds per fruit in hybrid seedlings.

Cross combination	No. of seedlings	Number of seeds per fruit ^z			
		SL ^y %	FS ^y %	S ^y %	VS ^y %
Seedless X Few seeds	71	31(43.7)	27(38.0)	10(14.1)	3(4.2)
Seedless X Seedy	93	23(24.7)	43(46.2)	21(22.6)	6(6.5)
Seedless X Very seedy	163	40(24.5)	68(41.7)	44(27.0)	11(6.8)
Few seeds X Few seeds	124	62(50.0)	52(41.9)	9(7.3)	1(0.8)
Few seeds X Seedy	100	38(38.0)	32(32.0)	24(24.0)	6(6.0)
Few seeds X Very seedy	273	32(11.7)	94(34.4)	104(38.1)	43(15.8)
Seedy X Very seedy	42	1(2.4)	11(26.2)	16(38.1)	14(33.3)
Very seedy X Very seedy	505	12(2.4)	95(18.8)	235(46.5)	163(32.3)

^z See footnote in Table 13.

^y SL: seedless, FS: few seeds, S: seedy, VS: very seedy.

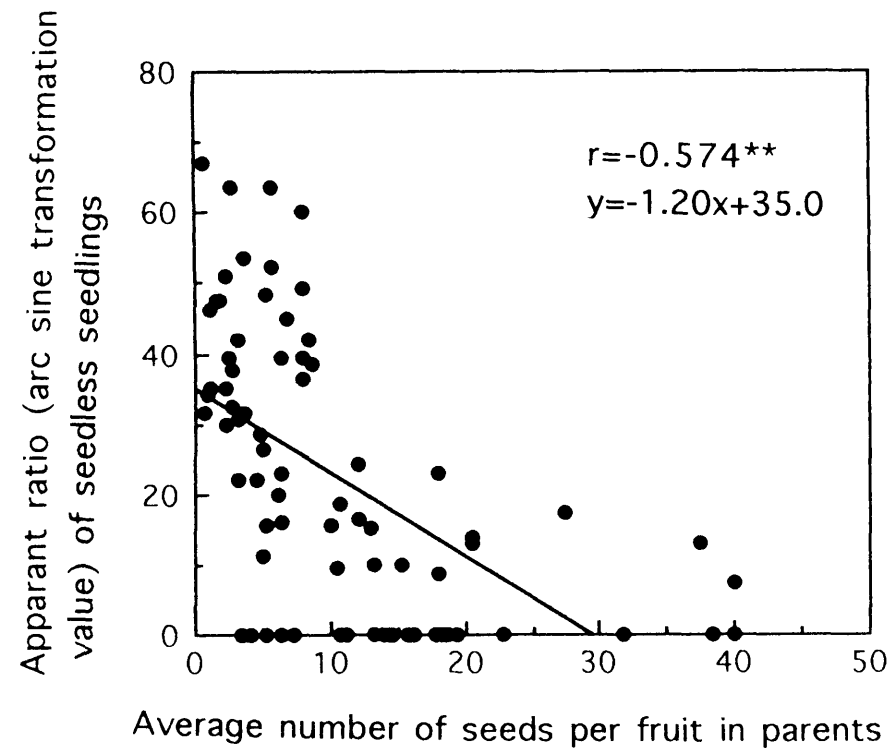


Fig. 12. Relationship between average number of seeds per fruit in parents and apparent ratio of seedless^z seedlings.

^z See footnote on Table 13.

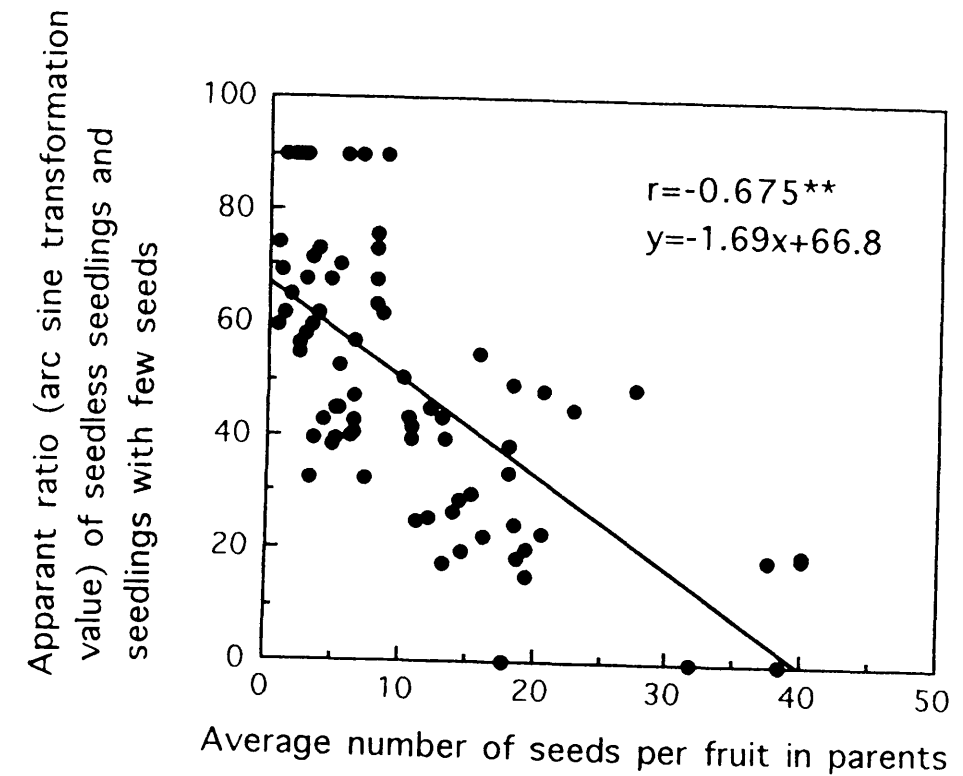


Fig. 13. Relationship between average number of seeds per fruit in parents and apparent ratio of seedless^z seedlings and seedlings with few seeds^z.

^z See footnote on Table 13.

核性の原因であり、これはウンシュウミカンの雄性不稔性が遺伝したものである (Iwamasa, 1966)。また、'ページ' 及び 'ロビンソン' の少核性は自家不和合性に起因する (Hearnら, 1969) が、ヒュウガナツ、クレメンティン、'オーランド'、ハッサクなどは自家不和合性であっても、単為結果性がほとんど無いため (三輪, 1951; Mustardら, 1956; Soost, 1956; Krezdorn・Robinson, 1958), 着生した果実は他家受粉しており、そのため果実の含核数は多い。

交雑育種により無核性品種を育成するには、これらの不稔現象を利用する必要がある。雄性不稔性 (Vardi・Spiegel-Roy, 1981; 上野, 1986),

自家不和合性 (Soost, 1965) については、その遺伝様式の解明が行われ、本章第1節で示したようにその利用が無核性品種の育成に有効であることがわかっている。しかし、雄性不稔性だけでは交雑実生の含核数を説明することはできず、含核数に及ぼす雌性不稔性及び単為結果性の影響が小さくないことが示唆されている (吉田・花折, 1990)。しかし、交雑実生集団の雌性不稔性や単為結果性を調査するには多大の労力を必要とするため、その遺伝については限られた研究しかなく (上野・七條, 1976; 根角ら, 1992), その解明が待たれている。

このように、含核数に影響を及ぼす個々の要因の遺伝様式について調査することも必要である。しかし、本節では育種的立場から、交配親と交雑実生の含核数との関係を明らかにし、無核又は少核の品種を作出する資料を得ることを目的とした。本節で解析に使用したデータは育種試験のものであり、1,371個体の実生を扱い、カンキツにおける含核数の遺伝様式を検討した。その結果、交雑実生の含核数は、交配親の含核数に影響されており、交配親の含核数が多くなるほどその交雑実生の含核数も多くなった。また、交雑実生の含核数は、一方の交配親の含核数の影響だけを受けているのではなく、両親の含核数から影響を受けていた。それゆえ、無核、少核品種を効率的に育成するためには含核数の少ない品種を両親に用いる必要のあることが明らかになった。

無核品種と少核品種の実生集団における含核数の分離を比較すると、少核品種同士の組み合わせは、無核×少核の組み合わせよりも無核及び少核の実生が多数出現した。一方、無核または少核と含核数の多い品種との交雑では、無核品種を親に用いたときの方が含核数の少ない実生の出現が多かった。しかし、これらの差は大きいものではなかった。無核品種と少核品種の実生での含核数の分離にあまり差が認められなかった理由としては、次のことが考えられた。各グループの交配親品種が一致しておらず、それが実生での分離に影響した点、少核とした品種の中にも平均含核数が1個未満ないしは1個前後の通常は無核とされる品種が多数含まれ、これらの品種は無核品種とは無核性に関連する遺伝子の組成にあまり差が無かったことである。

含核数中×多及び含核数多同士の交配組み合わせから無核の実生はほとんど出現せず、少核の実生も2割程度しか出現しなかった。このことから、含核数の多い品種同士の組み合わせからは無核品種の育成は困難であることが判明した。

親の平均含核数と交雑実生における無核個体の出現率をアークサイン変換した値との間の回帰式 ($y=1.20x+35.0$) から、親の平均含核数が0個の場合は無核個体の出現率が約3割で、親の平均含核数が30個になると無核個体は出現しないことになる。同様のことを無核及び少核個体の出現率について

計算すると、親の平均含核数が0個の場合は無核及び少核個体の出現率が約8割で、親の平均含核数が10個になると出現率は6割となり、親の平均含核数が40個になると無核及び少核個体は出現しないことになる。

本章第1節で、親の平均含核数から交雑実生における無核個体の出現率を推測する回帰式について報告した。その結果と本節で得られた結果とを比較すると、親の平均含核数が少ない場合には、本節の方が無核個体の出現率は少なくなり、親の平均含核数が多い場合には本節の方が無核個体の出現率は若干多くなった。前者の理由として、無核を本節では、無核果率80%以上としたのに対し、第1節では平均含核数1個未満としていることが考えられた。本節で用いた交配親についてこの点を検討してみると、無核果率が80%以上で含核数が1個以上の品種は存在しないが、含核数が1個未満で無核果率が80%未満の品種は3品種存在した。このように、本節の無核の基準は第1節よりも厳しかった。また、本節では第1節と異なり、親の平均含核数が小さくても無核の実生がまったく出現しない組み合わせがあった。これらのことが原因として、交配親の含核数が少ない場合でも無核果の出現率が低くなったものと推察された。一方、後者の理由として、本節では親の平均含核数が20-40前後の組み合わせからも無核の実生がある程度出現したのに対し、第1節では、親の平均含核数の最大値が約18で、その組み合わせにおいて無核の実生が出現していないことが考えられた。

親の平均含核数と無核個体の出現率との相関係数 ($r=0.574^{**}$) は、親の平均含核数と無核及び少核個体の出現率との相関係数 ($r=-0.675^{**}$) よりも少し低かった。実生個体が無核となるためには単為結果性が備わっていることが必要であるが、前者の場合には、親の平均含核数が少なくても、単為結果性がない品種間の交配組み合わせがあったため、このように相関係数の低下が認められたのであろう。

以上のように、無核又は少核の交雑実生の出現率及び交雑実生の含核数は、交配親の含核数からある程度推定できることが判明したが、それだけでは完全でなかった。すなわち、前述の通り、含核数は不稔性、不和合性などの諸要因に支配されているので、今後はそれらと含核数との関係、その遺伝について明らかにして行く必要がある。

従来は無核性や少核性品種の育成のために、ウンシュウミカン等無核性の品種を片親としても、もう一方に含核数の多い品種を親とすることもあり、その結果、無核及び少核性個体の発現をみないことも多かった。本節の結果から、両親の含核数に留意することにより、無核性品種の育成をある程度効率的に推進することが可能である。

摘 要

カンキツ交雑実生76組み合わせ1,371個体の含核数を調査し、交配親と交雑実生の含核数の関係を検討した。

1. 供試した交配親40品種の含核数は、無（無核果率80%以上）が7品種、少（無核果率80%未満、含核数5個以下）が12品種、中（含核数6-9個）が6品種、多（含核数10個以上）が15品種であった。

2. 交雑実生における含核数の分離を、交配親の含核数の程度によりグループ分けしたところ、交配親の含核数が少ないほど、実生での含核数も少ない傾向にあった。すなわち、含核数が少ないもの同士の交配では半数以上の実生が無核又は少核であったのに対し、含核数の多いもの同士の交配からは無核の実生はほとんど出現しなかった。

3. 親の含核数の平均値と無核個体の出現率との間には $r = -0.574^{**}$ の負の相関が、親の含核数の平均値と無核及び少核個体の出現率との間には $r = -0.675^{**}$ の負の相関があった。