六倍体カキ ‘藤原御所’ の実生における倍数性変異

田尾龍太郎¹*・山田あゆみ¹・江角智也¹・本杉日野²・杉浦 明¹¹京都大院農学研究科 606-8502 京都市左京区北白川追分町²京都府立大農学部附属農場 619-0244 京都府相楽郡精華町Ploidy Variations Observed in the Progeny of Hexaploid Japanese Persimmon (*Diospyros kaki*) ‘Fujiwaragosho’Ryutaro Tao¹*, Ayumi Yamada¹, Tomoya Esumi¹, Hino Motosugi² and Akira Sugiura¹¹Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502²University Farm, Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University, Seika-cho, Kyoto 619-0244

Summary

This study describes ploidy variations observed in plants obtained from immature embryos of hexaploid Japanese persimmon (*Diospyros kaki*) ‘Fujiwaragosho’. Embryo rescue culture was conducted for 103 embryos excised from seeds in young premature fruit in mid August. All but one embryo were germinated on MS agar medium containing 5 μ M zeatin. Flow cytometric measurements of the nuclear DNA content demonstrated that 67 of the 102 plants obtained were hexaploid while the remaining 35 plants were more than hexaploid. Although ploidy levels of the 35 plants appeared to be predominantly nonaploid or dodecaploid, several aneuploid plants seemed to exist. Chromosome counting in root tip cells of the plants obtained also confirmed that there was a ploidy variation in plants obtained by embryo rescue culture. The possible use of ‘Fujiwaragosho’ as a mother plant for the breeding of seedless non-astringent persimmon cultivars is discussed.

キーワード： 倍数性育種, *Diospyros kaki*, フローサイトメトリー, 完全甘ガキ

緒 言

カキ (*Diospyros kaki*) のほとんど全ての品種は六倍体 ($2n=90$) であるが、‘平核無’や‘宮崎無核’など一部の無核品種は九倍体 ($2n=135$) であることが確認されている (Namikawa・Higashi, 1928; 庄ら, 1990a; 庄ら, 1990b). これらの無核品種は全て渋ガキであり、食用に供するためには収穫後の人工脱渋が必要となる。しかし、脱渋には時間と手間がかかり、脱渋後の貯蔵性が悪くなるなどの問題を抱えていることから、種子の有無に関らず甘ガキとなる完全甘ガキでの無核品種の作出がカキの育種目標の一つとして考えられる。

カキでは自然発生した 12 倍体が確認されていないため、現存する九倍体品種は六倍体由来の非還元配偶子 ($n = 6x = 90$) と還元配偶子 ($n = 3x = 45$) の接合によって生じたとする説が有力である。これまでに、非還元雄性配偶子が巨大花粉として受粉用品種の花粉に混在することが明らかにされている (Sugiuraら, 2000). また、この巨大花粉と通常花粉とを分別し、巨大花粉を六倍体品種の

雌花に受粉して形成された不完全種子の胚を、退化する前に摘出して救助培養することで、九倍体の作出が可能であることも示されている (Sugiuraら, 2000). しかし、自然条件下では、多くの正常な花粉との競争に勝つてのみ受精に与ることができる巨大花粉よりも、非還元卵が受精に与り九倍体の種子形成が行われる確率のほうが高いと考えられる。

著者らは、カキにおける非還元卵の発生を確認し、その育種的利用を図るための研究に着手した。その中で、完全甘ガキ 10 品種の実生の倍数性を調査したところ、‘藤原御所’の後代実生において特異的に倍数性変異個体が多く生じることを見出したので、その結果について報告する。

材料および方法

京都大学農学部附属京都農場植栽の‘藤原御所’成木の果実を供試した。開花時に‘晩御所’の花粉を受粉したが、袋かけは行なわなかった。用いた花粉は、Sugiuraら (2000) と同様の方法で採取し、使用するまで 4℃で保存した。受粉する前に、花粉を 0.9 M マンニトール cell and protoplast washing (CPW) solution (Draperら, 1988) に浸漬し、攪拌しながら 2 時間吸水させた後に花粉の正射影図の面積を測定して、巨大花粉の存在率が 1% 以下である

2002年10月28日 受付. 2003年2月20日 受理.

*Corresponding author. E-mail: rtao@kais.kyoto-u.ac.jp

ことを確認した。果実を2001年8月中旬(受粉後約80日)に採取し、水道水で丸洗いした後に、70%エタノールに数分間浸して滅菌し、種子(長径15 mmほど)を無菌的に取り出した。これらの種子中で、5 mm程度の長さに発達している胚を切り出してゼアチン5 μ M添加のMS寒天培地(Murashige・Skoog, 1962)に置床して救助培養を行った(Tao・Sugiura, 1992)。ただし、救助培養した中に他の種子と比べ胚の発達が悪い小胚種子が1個存在した。取り出した種子の胚乳の倍数性を以下の方法で調査した。Partec社のプロイディアナライザー PA型 User Manual (1999)に従い、胚乳から核を遊離させ、20 μ mのナイロンメッシュでろ過した。遊離核を含むろ液を4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)で染色し、プロイディアナライザー (Partec, Germany)によりDNA量を測定して倍数性を判定した。同様に、培養した胚から発芽した実生102個体についても、シュートの下部組織を用いてプロイディアナライザーで倍数性を調査した。さらに、このうちの54個体の核のDNA量をTamuraら(1998)の方法に従って、フローサイトメータ (FACSCalibur, Becton-Dickinson, USA)で再び測定した。培養シュートの先端の若い葉を抽出バッファー [10mM Tris-HCl (pH 7.0), 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% PVP-K30, 0.1% Triton X-100] 1ml中でカミソリにより刻んだ。氷上に10分間放置した後に、溶液を20 μ mのナイロンメッシュでろ過し、核を単離した。核が含まれているろ液に propidium iodide (PI)を最終濃度が100 μ g/mlになるように加えて5分間放置した後、フローサイトメータで核のDNA量を測定した。比較のため、'次郎'、'藤原御所'、'富有'、'平核無'の4品種についても同様の

測定を行った。各個体の核DNA含量のデータは'次郎'の核のDNA含量が既報 (Tamura ら, 1998) と同じ5.0 pg/2C (2n世代)であるとして算出した。

胚培養により得られたシュートの一部については、その基部を1.5 mM IBA 50%エタノール水溶液に数秒間浸した後、ホルモンフリーの1/2MS (1/2N)培地に植え付けて発根処理を施した (Tao ら, 1988)。植え付け後初めの10日間は暗黒条件下で培養し、その後は18時間日長条件下で培養した。採取した根端を4℃暗黒下で2 mM 8-オキシキノリンに浸し6~9時間前処理した後、エタノール:酢酸固定液 (3:1)に浸漬して固定した。固定した根端を蒸留水で洗浄した後、酵素液 [Cellulase RS (4% w/v), Pectolyase Y-23 (1% w/v), 0.07 M KCl, 7.5 mM Na₂EDTA, pH4.0] で1~3時間37℃で処理した。酵素液を洗い流し、サンプルをスライドガラス上で展開し、2%ギムザ液で染色した。根端分裂細胞の染色体を光学顕微鏡で観察した。

結 果

胚乳の倍数性については、正常種子と小胚種子でそれぞれ1個ずつ、さらに胚の含まれていない無胚の種子で4個が正常な倍数性である九倍体よりも大きな倍数性を示した (データ省略)。これらの胚乳の倍数性は18~24倍体であると推定されたが、正確な倍数性を決定することはできなかった。

種子から取り出して胚培養した103個の胚のうち、102個の胚が発芽した。プロイディアナライザーによる倍数性測定の結果、これら102個体のうち67個体が六倍体であると考えられ、残りの35個体が六倍体よりも大きな倍数性であることが示された。これら六倍体よりも大きな倍数性の35個体と19個体の六倍体と考えられる個体の

第1表 フローサイトメトリーによる'藤原御所'実生²の核DNA量測定結果

個体番号	DNA量 (pg/2C)	個体番号	DNA量 (pg/2C)	個体番号	DNA量 (pg/2C)
75	4.6	42	6.8	51	8.6
71	4.8	18	6.9	31	8.7
8	4.8	70	7.0	63	9.2
49	4.9	15	7.0	65	9.2
72	4.9	91	7.0	5	9.3
55	4.9	54	7.1	28	9.6
62	4.9	17	7.2	48	9.8
81	5.0	60	7.2	52	10.1
12	5.0	47	7.2	97	10.1
73	5.0	68	7.3	16	10.1
95	5.0	93	7.4	83	10.4
43	5.1	32	7.5	86	10.6
96	5.1	50	7.5		
25	5.2	53	7.6		
87	5.2	22	7.7		
90	5.2	99	7.8		
23	5.4	76	7.9		
7	5.7	84	7.9		
101	5.8	44	8.0		
次郎	5.0	74	8.0		
藤原御所	5.1	66	8.1		
富有	5.1	69	8.1		
平核無	7.7	20	8.2		

²プロイディアナライザーによる分析で6xと判定された実生を表の左側の列に、それ以外の倍数性であると判定された実生を残りの2列に示した

第1図 フローサイトメトリーによる'次郎'および'藤原御所'実生の核のDNA量の測定

図中の矢印と数字はそれぞれ2Cと4Cのピークを表す

² number of inflorescent particles

^y relative inflorescence intensity

第2図 '藤原御所' 実生 102個体の核の DNA 量の分布

核 DNA 量をフローサイトメータで測定した結果, プロイディアナライザーによる分析で六倍体であると示された実生の核 DNA 含量はいずれも 4.6-5.8pg/2C であり, ほかの系統は全て 6.0 pg/2C 以上であった (第 1 表, 第 1 図). そこで, プロイディアナライザーによって六倍体であると判定された実生の核 DNA 量は全て 4.0-6.0 pg/2C の範囲にあると仮定して, 得られた全ての実生 (102 個体) の核 DNA 量の分布を示したのが第 2 図である. 六倍体である '次郎' や '富有', そして '藤原御所' の核 DNA 量が 5.0 あるいは 5.1pg/2C であり, 九倍体の '平核無' の核 DNA 量が 7.7pg/2C であったことを考えると, 六倍体よりも大きな倍数性を示すと考えられた個体の倍数性は九倍体や 12 倍体あるいは異数体であると推定された (第 1 表, 第 2 図). なお, '藤原御所' の 18 倍性であると推定された異常な倍数性の胚乳を持った 2 つの種子由来の実生 (個体番号 83, および 84-小胚種子由来) はいずれも六倍体より大きな倍数性を示し, それぞれ 12 倍体と九倍体であるものと推定された. 根端分裂細胞の染色体を観察したところ, 核 DNA 量が六倍体に比べて大きい個体では, 染色体数が六倍体のものよりも多いことが確認された. しかしながら, 染色体数が非常に多いため, 正確な染色体数を決定することはできなかった (第 3 図).

考 察

多くの植物で, 非還元卵が倍数体の発生に関っているのではないかと考えられている (Den Nijs・Peloquin, 1977; Douches・Quiros, 1988; Ortiz ら, 1992; Tavoletti ら, 1991; Takamura・Miyajima, 1999; Kato・Mii, 2000; Crespel ら, 2002). 本実験の結果, '藤原御所' 実生に高頻度で倍数性変異が生じることが明らかになった. しかしながら, これら倍数性変異個体が, 非還元卵由来のものであるのかどうかは明確ではない. もし非還元卵由来であるとすれば還元雄性配偶子との接合によって生じた実生は全て九倍体になるものと考えられるが, 得られた実生の倍数性は, 核 DNA 量の測定や根端分裂細胞の染色体観察から, 九倍体や 12 倍体であり, さらに多くの

第3図 '藤原御所' 実生の根端分裂細胞の染色体像

異数体も含まれるものと推定された. また, 非還元の胚の細胞から非還元卵や中央細胞が生じたとすれば, 胚乳の倍数性は 15 倍性になると考えられるが, 倍数性変異が生じた種子の胚乳の倍数性はほとんど全てが正常な九倍性であった. 倍数性変異個体が得られた種子で異常な倍数性を示す胚乳を持つものは個体番号 83 と 84 が得られた種子のみであり, プロイディアナライザーによる分析では, これらの胚乳の倍数性はいずれも 18 倍性であるものと推定された. 核 DNA 量の測定結果から判断すると個体番号 83 は 12 倍体, 個体番号 84 は九倍体である. もし, 個体番号 83 が非還元卵と非還元花粉の接合により生じたとすれば, 胚乳の倍数性は理論値に適合するが, 個体番号 84 の個体については理論値とは異なる. このようなことから, '藤原御所' では減数分裂によって卵細胞形成された後に, その倍数性に変異しやすく, 倍数性に変異した卵細胞が受精に与るために倍数性変異実生が多く生じると考えるのが妥当なのかもしれない. あるいは, 減数分裂後卵細胞が退化して, 体細胞から卵細胞が形成され, それが花粉管の精核と接合して実生が生じたのかもしれない. しかしながら, この場合でもなぜ実生の倍数性が九倍体ではなく, 多くの異数体や 12 倍体が生じたのか明らかではない. そもそも, '藤原御所' の実生が接合によって生じたのかどうかは明らかではなく, 無性生殖によって胚が発生し, その過程で染色体変異が生じている可能性も捨てきれない. 今後, '藤原御所' の胚発生過

程の顕微鏡観察や得られた実生の DNA 分析を行うことで、‘藤原御所’の実生に見られる倍数性変異の原因が明らかになると思われる。

今回、完全甘ガキ品種‘藤原御所’の実生にさまざまな倍数性や異数性のものが現れることが明らかになったが、このことは‘藤原御所’が無核完全甘ガキ品種を育成するための有望な育種母本になり得ることを示すものである。つまり、完全甘ガキは劣性形質であり、また完全甘の形質を支配する劣性の遺伝子は、完全甘ガキ以外の品種にはほとんど存在していない(池田ら, 1985)。そのため、六倍体より大きな倍数性を示す倍数性の異常な‘藤原御所’実生とほかの完全甘ガキ品種とを交雑すれば、九倍体や異数体の完全甘ガキ品種を作成することが可能であり、それらの果実は無核形質を持つことが期待される。

摘 要

8月中旬に採取した六倍体カキ(*Diospyros kaki*)‘藤原御所’の未熟果実より得られた種子中から胚を切り出し救助培養を行った。植え付けた103個の胚のうち102個がゼアチン5 μ Mを添加したMS寒天培地で発芽した。得られた102個体の植物体の倍数性をフローサイトメトリーによって調査したところ、67個体が六倍体であり、残りの35個体が六倍体よりは大きな倍数性を示すことが明らかになった。これらの多くは九倍体あるいは12倍体であり、中には異数体も存在するものと推定された。得られたいくつかの植物体について、根端分裂細胞の染色体観察を行ったところ、フローサイトメトリーで倍数性変異がみられると推定された個体の染色体数は六倍体の90本より多いことが確認された。無核完全甘ガキ品種を育成するための育種母本としての‘藤原御所’の利用可能性について議論した。

引用文献

- Crespel, L., S. Gudin, J. Meynet, and D. Zhang. 2002. AFLP-based estimation of 2n gametophytic heterozygosity in two parthenogenetically derived dihaploids of *Rosa hybrida* L.. Theor. Appl. Genet. 104: 451-456.
- Den Nijis, T. P. M. and S. J. Peloquin. 1977. 2n gametes in potato species and their function in sexual polyploidization. Euphytica 26: 585-600.
- Douches, D. S. and C. F. Quiros. 1988. Genetic strategies to determine the mode of 2n egg formation in diploid potatoes. Euphytica 38: 247-260.
- Draper, J., R. Scott, P. Armitage, and R. Walden. 1988. Plant genetic transformation and gene expression. Blackwell Sci. Publ., Oxford, U. K.
- 池田 勇, 山田昌彦, 栗原昭夫, 西田光夫. 1985. カキの甘渋

の遺伝. 園学雑. 54: 39-45.

- Kato, J. and M. Mii. 2000. Differences in ploidy levels of inter-specific hybrids obtained by reciprocal crosses between *Primula sieboldii* and *P. kisoana*. Theor. Appl. Genet. 101: 690-696.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Namikawa, I. and M. Higashi. 1928. On the chromosomes in *Diospyros kaki* L. f. and *Diospyros lotus* L. Bot. Mag. 42: 436-438.
- Ortiz, R., L. P. Bruederle, T. Laverty, and N. Vorsa. 1992. The origin of polyploids via 2n gametes in *Vaccinium* section *Cyanococcus*. Euphytica 61: 241-246.
- プロイディアナライザー PA 型 User Manual. 1999. Partec, Germany.
- Sugiura, A., T. Ohkuma, Y. A. Choi, R. Tao, and M. Tamura. 2000. Production of nonaploid (2n=9x) Japanese persimmons (*Diospyros kaki*) by pollination with unreduced (2n=6x) pollen and embryo rescue culture. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 125: 609-614.
- Takamura, T. and I. Miyajima. 1999. Varietal and individual differences in cross-compatibility in the 2x $\times$ 4x crosses of cyclamen (*Cyclamen persicum* Mill.). J. Japan. Soc. Hort. Sci. 68: 55-60.
- Tamura, M., R. Tao, K. Yonemori, N. Utsunomiya, and A. Sugiura. 1998. Ploidy level and genome size of several *Diospyros* species. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 67: 306-312.
- Tao, R., H. Murayama, K. Moriguchi, and A. Sugiura. 1988. Plant regeneration from callus cultures derived from primordial leaves of adult Japanese persimmon. HortScience. 23: 1055-1056.
- Tao, R. and A. Sugiura. 1992. Micropropagation of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* L.), p426-440. In: Y. P. S. Bajaj (ed). Biotechnology in agriculture and forestry. vol. 18. High-tech and micropropagation 2. Springer-Verlag, New York.
- Tavoletti, S., A. Mariani, and F. Veronesi. 1991. Cytological analysis of macrosporogenesis and microsporogenesis of a diploid alfalfa clone producing male and female 2n gametes. Crop Sci. 31: 1258-1263.
- 庄 東紅, 北島 宣, 石田雅士, 傍島善次. 1990a. 栽培カキの染色体数について. 園学雑. 59: 289-297.
- 庄 東紅, 北島 宣, 石田雅士. 1990b. カキ品種‘平核無’の原木および後代の染色体数について. 園学雑. 59: 479-485.