カンキツ類の三倍体品種の育成 (第1報) ウンシュウミカンと四倍体ポンカンの交雑による雑種三倍体の作出

金好純子・加納徹治¹・桑田祐二・平尾 晃¹・中谷宗一¹・小林省藏²

広島県立農業技術センター 生物工学研究所 739-01 広島県東広島市八本松町原

¹広島県立農業技術センター 果樹研究所 729-24 広島県豊田郡安芸津町三津

²果樹試験場 カキ・ブドウ支場 729-24 広島県豊田郡安芸津町三津

Breeding of Triploid Citrus Cultivars I. Production of Triploids from Satsuma Mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) × Tetraploid Ponkan Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) Crosses

Junko Kaneyoshi, Tetuji Kanou¹, Yuuji Kuwata, Akira Hirao¹, Souichi Nakatani¹ and Shozo Kobayashi²

Institute of Biotechnology, Hiroshima Prefectural Agricultural Research Center, Hachihonmatsu, Higashi-Hiroshima 739-01

Institute of Fruit Tree, Hiroshima Prefectural Agricultural Research Center, Mitsu, Akitsu, Hiroshima 729-24
Persimmon and Grape Center, National Institute of Fruit Tree Science, Mitsu, Akitsu, Hiroshima 729-24

Summary

Crosses between satsuma mandarins and tetraploid ponkan were made to produce triploid hybrid cultivars.

Triploid embryos were obtained from the crosses using three seed parents, 'Ootsu No. 4', 'Aoshima' and 'Imamura', which produced comparatively small numbers of embryo per seed. Of the three, the frequency of triploid embryo production per fruit was highest in 'Aoshima'. The frequency of triploid embryo production per seed in undeveloped seeds was higher than that in fully developed seeds. By the embryo rescue technique, triploid plants were obtained efficiently from the embryos of undeveloped seeds. Tetraploid plants were also obtained from fully developed seed of 'Ootsu No. 4' and 'Aoshima'.

RAPD analysis showed that all the triploid plants were hybrids and the tetraploid plants were also hybrids or natural auto-tetraploids. Two hybrid embryos in one seed with identical banding RAPD patterns on agarose gels, indicate that the embryos are derived from the same single egg cell.

緒 言

現在、経済栽培されているカンキツ類は、食べ易さ、加工し易さから無核、あるいは種子が極めて少ない品種が多い。広島県でも交雑育種により新しいマンダリン類の育成を行っているが、無核性は重要な育種目標の一つである。

これまで無核性品種は、ウンシュウミカンのやく退化等の遺伝的不稔性を、交雑育種により利用する方法や(西浦ら, 1983; 奥代ら, 1991), グレープフルーツ, スイートオレンジの例のように放射線で無核性の

突然変異を誘発する方法(Hensz, 1971; Hearne, 1984)などにより育成されてきた。

無核性品種育成のもう一つの手法として、三倍体の利用があげられる。アメリカでは比較的早い時期から、三倍体を利用した無核性品種の育成に取り組み、'Oroblanco' および 'Melogold' の2品種を育成している(Soost・Cameron, 1980, 1985)。我が国においても、三倍体を利用した無核性品種の育成が試みられ、すでにいくつかの三倍体が作出されているが(立川ら, 1961; 生山ら, 1982)、品種の育成までには至っていない。しかし、上記のように、三倍体の優れた品種が既に育成され、その有効性が実証されているため、無

核性品種育成への三倍体の利用は、今後、益々重要になると考えられる。

カンキツ類では三倍体は、二倍体間の交雑により得られる小粒種子から得る方法 (Lapin, 1937; Esen・Soost, 1971) と、二倍体と四倍体の交雑により得られる完全種子 (Longley, 1926; Frost, 1948) あるいは不完全種子 (Starrantino・Recupero, 1981; Oiyama ら, 1991) から得る方法が報告されている。これら手法のうち、単胚性二倍体を種子親として、四倍体との交雑により得られる不完全種子中の胚は、すべて三倍性胚であり、胚培養により、効率良く三倍体を得られることから、三倍体育成の非常に有効な手法であると考えられる。しかし、多胚性二倍体を種子親とした場合、四倍体との交雑により、育種素材として重要な四倍体は得られているが (生山, 1992)、三倍体を得られたという報告はない。カンキツ類では主要な経済品種の多くが多胚性二倍体品種であることから、これら多胚性二倍体品種を、三倍体育成の育種親として活用する技術の開発は重要である。そこでわが国の主要経済品種である多胚性のウンシュウミカンを種子親として用い、同様に重要な品種であるポンカンの四倍体との交雑を行い、胚培養を利用して三倍体の作出を試みた。

材料および方法

ウンシュウミカンの '興津早生'、'大津四号'、'青島'、'今村' を種子親として、'中野 3 号ポンカン' の自然同質四倍体 (以下四倍体 '中野 3 号ポンカン') を花粉親に用いて、5 月中旬～下旬に広島県立農業技術センター果樹研究所圃場で人工交配を行った。交配は各組合せとも開花直前のつばみを用い、25℃の恒温器内で開やくした花粉で受粉した。結実果は 11 月中旬に収穫し、果実中の種子数を調査した。種子のうちいいな状態のものを不完全種子、正常に発育したものを完全種子とした。不完全種子、完全種子ともに 0.5% アンチホルミンで 15 分間滅菌し、滅菌水で 4 回洗った後、種皮を顕微鏡下ではなく皮し、1 種子中の胚数を調査した。次いで、MS 基本培地にアデニン 40 mg/l、麦芽エキス 500 mg/l、ショ糖 3%、Gellan Gum 0.2% を添加した培地に胚分離して置床し、25℃、16 hr 日長、3,000 lx の条件下で培養した。

染色体数の調査は、培養 5～10 日後に根端 0.5 mm を採取し、生山 (1981) の方法により行った。

雑種の識別は RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 分析 (Williams ら, 1990) により行った。

種子親および花粉親に用いた 4 品種と、胚培養を行って根端の染色体数を調査し、倍数体であることを確認した三倍体 17 個体と四倍体 4 個体から葉 50 mg をサンプリングし、SDS 法 (Honda・Hirai, 1990) により全 DNA を抽出した。RAPD 分析のための PCR (Polymerase Chain Reaction) には、種子親と花粉親の識別が明確にできる、Operon 社 (Alameda, California) のランダムプライマー 2 種類 (OPA-8, 9) を用い、三倍体および四倍体の雑種識別を行った。PCR の反応液は 10 mM Tris-HCl (pH 9.0)、50 mM KCl、0.1% Triton X-100 の組成の reaction buffer (Promega 社) を用い、0.04 units/ μ l Taq DNA Polymerase (Promega 社)、2.0 mM $MgCl_2$ 、0.1 mM dNTPs、0.2 μ M プライマー、4 ng/ μ l サンプル DNA とし、全量 25 μ l で反応を行った。PCR 反応はアトー (株) のザイモリアクター II 型式 AB-1820 で行い、反応条件は変性 94℃ 1 分、アニーリング 40℃ 2 分、伸長 72℃ 3 分で 45 サイクルとした。PCR 反応の結果得られた増幅産物は反応液 7 μ l を、0.5 μ g/ml ethidium bromide を含む 1.4% アガロースゲルで電気泳動後、紫外線照射下で写真撮影して多型を検出した。

結 果

1. 種子形成および胚数

果実中の不完全種子、完全種子数は種子親品種によって異なっていたが、いずれの品種においても、完全種子より不完全種子の形成率が高かった。1 果あたりの不完全種子数は、熟期の遅い品種ほど多い傾向にあった。不完全種子をはく皮すると、いずれの品種でも珠孔付近に複数の胚があり、1 種子あたりの胚数は '大津四号'、'青島'、'今村' に比べて、'興津早生' が多かった (第 1 表)。

得られた種子の胚培養を行ったところ、発根した胚を含む種子の割合は、'青島' では不完全種子が 37.5% であり、完全種子の 100% に比べて低く、'大津四号'、'今村' でも同様の傾向にあった。また、不完全種子中の胚数の多かった '興津早生' の不完全種子は全く発根しなかった。1 種子当たりの発根胚数は、'大津四号'、'青島'、'今村' のいずれの種子親品種でも、完全種子が不完全種子に比べて多かった (データ非表示)。

2. 成熟胚の染色体数

発根した胚の染色体数を調査したところ、不完全種子においては二倍性胚と三倍性胚が見られ、三倍性胚の出現率は '青島' で 61.5%、'今村' で 60.0% と高く、

Table 1. Numbers of seeds and embryos obtained from satsuma mandarins $\times$ autotetraploid 'Nakano No.3 Ponkan' crosses.

Seed parent	No. of flowers crossed	No. of fruits set	No. of seeds/fruit		No. of embryos/seed	
			Un-developed	Fully developed	Un-developed	Fully developed
Okitsu Wase	70	51	0.1	0	29.4	—
Ootsu No.4	137	92	0.4	0.1	14.4	10.3
Aoshima	31	19	2.1	0.1	9.4	26
Imamura	60	29	1.2	0.1	11.1	10.5

Table 2. Ploidy levels of embryos from satsuma mandarins $\times$ autotetraploid 'Nakano No.3 ponkan' crosses.

Seed parents	seed	No. of embryos				No. of 3x embryos/seed
		Total	2x	3x	4x	
Ootsu No.4	undeveloped	26	23	3	0	0.08
	fully developed	73	66	4	3	0.36
Aoshima	undeveloped	13	5	8	0	0.20
	fully developed	8	7	0	1	0
Imamura	undeveloped	5	2	3	0	0.09
	fully developed	4	4	0	0	0

‘大津四号’は11.5%と低かった(第2表)。一方、完全種子中には二倍性胚、三倍性胚および四倍性胚が存在していた。そのうち三倍性胚は‘大津四号’のみで見られ出現率は調査した胚の5.5%であった。また四倍性胚の出現率は‘大津四号’で4.1%、‘青島’で12.5%であったが、‘今村’では0%であった。また、完全種子では1種子中に2個の倍数性胚が出現する場合があります。‘大津四号’において1種子中に三倍性胚が2個、あるいは四倍性胚が2個出現した完全種子が、いずれも1種子あった。1種子当りの三倍体出現数は、‘大津四号’の完全種子が最も多く、次いで‘青島’の不完全種子が多かった。しかし、1果当りの種子形成数は、‘青島’と‘今村’の不完全種子が多く、‘大津四号’の完全種子は少ないことから、不完全種子と完全種子を合わせた1果当りの三倍性胚出現数は、‘青島’で最も高く、ついで‘今村’、‘大津四号’の順であった。発根した三倍性胚、四倍性胚のうち、青島温州の不完全種子の三倍性胚1個は発芽しなかったが、その他はすべて発芽して完全な植物体に生育し、三倍体17個体、四倍体4個体が得られた。

3. 雑種判定

RAPD分析での雑種判定の結果、ウンシュウミカン $\times$ 四倍体‘中野3号ボンカン’で得られた倍数体のうち、

三倍体は、2種類のプライマーいずれを使用した場合でも、すべて雑種であると判定された(第1図)。また完全種子から得られた四倍体は、2種類のプライマーどちらでも‘大津四号’ $\times$ 四倍体‘中野3号ボンカン’の2個体のみが雑種であると判定でき、他は種子親と同じバンディングパターンを示したため、自然同質四倍体であると考えられた(第2図)。1種子中に存在した2個の倍数性胚由来の実生のうち、‘大津四号’ $\times$ 四倍体‘中野3号ボンカン’の三倍体(第1図のレーン6と7)および四倍体(第2図のレーン5と6)はいずれも同じバンディングパターンを示し、かつ雑種であることが確認された。

考 察

カンキツ類の二倍体 $\times$ 四倍体から出現する倍数性植物について、Esen and Soost (1972, 1973)は単胚性品種を用いて詳細な研究を行い、非還元性の雌性配偶子と還元性の雄性配偶子との受精によって形成される四倍性胚は正常に発育するが、三倍性胚はその大部分が胚発生の過程で退化することを明らかにした。また、二倍体 $\times$ 四倍体における種子形成について、不完全種子の割合が高くなることは、これまでの報告で明らかにされている(立川ら, 1961)。著者らが供試したウンシュウミカン4品種においても、完全種子に比べ不

Fig. 1. RAPD analysis of gels from triploids obtained by satsuma mandarins $\times$ autotetraploid 'Nakano No. 3 ponkan' crosses. A: OPA-8 primer, B: OPA-9 primer, lane 1, 23: DNA size marker (100 bp ladder), lane 2: 'Ootsu No. 4', lane 3: 'Aoshima', lane 4: 'Imamura', lane 5: autotetraploid 'Nakano No. 3 ponkan', lanes 6-9: Budded triploids from fully developed seeds of 'Ootsu No. 4', lanes 10-12: Triploids from undeveloped seeds of 'Ootsu No. 4', lanes 13-19: Triploids from undeveloped seeds of 'Aoshima', lanes 20-22: Triploids from undeveloped seeds of 'Imamura'.

Fig. 2. RAPD analysis of gels from tetraploids obtained by satsuma mandarins $\times$ autotetraploid 'Nakano No. 3 ponkan' crosses. A: primer OPA-8, B: OPA-9 primer, lane 1: 'Ootsu No. 4', lane 2: 'Aoshima', lane 3: autotetraploid 'Nakano No. 3 ponkan', lanes 4-6: Tetraploids from fully developed seeds of 'Ootsu No. 4', lane 7: Tetraploids from fully developed seeds of 'Aoshima', lane 8: DNA size marker (100 bp ladder).

完全種子が多く出現し、同様の結果であった。

単胚性二倍体 $\times$ 四倍体で得られる不完全種子からの植物体は、すべて三倍体であることが報告されている (Starrantino・Recupero, 1981)。本実験の結果では、ウンシュウミカン $\times$ 四倍体 '中野 3 号ポンカン' の不完全種子からは二倍性胚と三倍性胚が得られた。このう

ち三倍性胚は RAPD 分析の結果すべて雑種であった。多胚性品種では珠心由来の胚が多数発生することが知られており (Frost, 1926)、ウンシュウミカン $\times$ 四倍体 '中野 3 号ポンカン' で得られた二倍体も珠心胚実生であると考えられる。カンキツ類の多胚性品種においては、種子中の珠心胚の発生が少ないほど受精胚の発

育は進み、交雑実生が得られ易いことが知られている (Frost・Soost, 1968). 本実験でも、三倍体が得られた‘大津四号’、‘青島’、‘今村’の種子親3品種は不完全種子中の胚数がいずれも少なく、珠心胚形成能が低いことが三倍性雑種胚が得られ易い要因であると考えられる。ウンシュウミカンの中では‘今村’は胚数が少なく雑種が得られ易いことが報告されており (中谷ら, 1980; 奥代ら, 1981), 本実験の結果と一致する。また、‘青島’も四倍体との交雑で雑種が得られ易いことが、本実験の結果から明らかになり、1果当りの不完全種子の形成数も多いことから、供試した4品種の中では、最も効率よく三倍体を作成できた。

一方、完全種子の胚の染色体数調査および雑種判定の結果、種子親に大津四号を用いた時にのみ雑種三倍性胚と雑種四倍性胚が得られ、いずれも1種子中に2個存在していた。カンキツの単胚性品種においては1種子中に複数の雑種胚が形成されることがあり、これまで多くの報告がある (Frost, 1926)。三倍性胚においても同様な現象はみられ、単胚性二倍体×四倍体で得られる不完全種子中に複数の三倍性胚が存在し、同じアインザイムパターンを示すことから、1つの受精卵から発生したクローンであると報告されている (Oiyama・Kobayashi, 1990)。本実験においても‘大津四号’×四倍体‘中野3号ボンカン’の1つの完全種子中に存在していた2個の三倍性および四倍性胚は、RAPD分析によりいずれも雑種であり、1種子中の2個の雑種胚は同じバンディングパターンを示した。このことから多胚性品種においても単胚性品種と同様、1種子中に複数の雑種胚が生じ、これらの胚は1つの受精卵から発生したクローンであると推察される。多胚性二倍体品種では珠心胚由来の実生中に同質四倍体が偶発的に出現することが明らかにされている (Frost, 1925)。本実験でも完全種子から得られた四倍性胚のうち‘大津四号’の1胚、‘青島’の1胚は、RAPD分析の結果、自然同質四倍性胚であった。このウンシュウミカン×四倍体‘中野3号ボンカン’の完全種子から得られた雑種四倍体と自然同質四倍体は、今後いずれも三倍体品種育成の交配親として活用できると考えられる。

本実験では多胚性であるウンシュウミカンを種子親として四倍体との交雑により、胚培養を用いて三倍体を作成できることを明らかにした。今後、種子中の胚数を減少させる要因の解明、雑種胚の種子中の大きさ順位の解明、不完全種子中の胚の植物体再生率の向上

を図ることにより、さらに効率的な三倍体雑種植物の作出が可能であると考えられる。

摘 要

優良な形質をもつ多胚性二倍体品種を三倍体品種育成の育種母本として活用するため、ウンシュウミカンを種子親に用い、四倍体‘中野3号ボンカン’を花粉親とした交雑による三倍体の作出を試みた。

種子親に用いた4品種のうち、三倍性胚は比較的胚数の少ない3品種で得られ、‘大津四号’では不完全種子および完全種子、また、‘青島’と‘今村’では不完全種子から得られた。三倍性胚の1果当りの出現率は‘青島’が最も高かった。また、1種子当りの三倍性胚の出現率は、完全種子よりも不完全種子で高く、不完全種子中の胚を培養することにより、高率で三倍体実生が得られた。また、‘大津四号’、‘青島’の完全種子からは四倍体実生も得られた。

RAPD分析の結果、三倍性体実生はすべて雑種であり、四倍体実生は雑種あるいは自然同質四倍体であった。1種子中に存在した2個の倍数性胚由来の実生は同じバンディングパターンを示し、1つの受精卵から発生したクローンであると考えられた。

謝 辞 本研究を行うに当たり、供試樹等のご協力をいただいた広島県立農業技術センター果樹研究所 松本要主任研究員、中元勝彦研究員に厚くお礼申し上げます。

引用文献

- Esen, A. and R. K. Soost. 1971. Unexpected triploids in citrus: their origin, identification and possible use. *J. Hered.* 62: 329-333.
- Esen, A. and R. K. Soost. 1972. Tetraploid progenies from $2x \times 4x$ crosses of citrus and their origin. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 97: 410-414.
- Esen, A. and R. K. Soost. 1973. Seed development in citrus with special reference to $2x \times 4x$ crosses. *Amer. J. Bot.* 60: 448-462.
- Frost, H. B. 1925. Tetraploidy in citrus. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 11: 535-537.
- Frost, H. B. 1926. Polyembryony, heterozygosis and chimeras in citrus. *Hilgardia* 1: 365-402.
- Frost, H. B. 1948. Genetics and breeding. In: *The Citrus Industry*, vol. I, H. J. Webber and L. D. Batchelor (eds.). University of California Press, Berkeley and Los Angeles, 817-885.
- Frost, H. B. and R. K. Soost. 1968. Seed reproduction: development of gametes and embryos. In: *The Citrus Industry*, vol. II, W. Reuther, L. D. Batchelor and H. J. Webber (eds.). University of California.

- 290-324.
- Hearne, C. J. 1984. Development of seedless orange and grapefruit cultivars through seed irradiation. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 109 : 270-273.
- Hensz, R. A. 1971. Star Ruby, a new deep-red-fleshed grapefruit variety with distinct tree characteristics. J. Rio Grande Hort. Soc. 25 : 54-58.
- Honda, H. and A. Hirai. 1990. A simple and efficient method for identification of hybrids using non-radioactive rDNA as probe. Japan. J. Breed. 40 : 339-348.
- Lapin, W. K. 1937. Investigation of polyploidy in citrus. U. S. S. R. All-Union Sci. Res. Inst. Humid Subtropics Works. 1 : 1-68.
- Longley, A. E. 1926. Triploid citrus. Washington Acad. Sci. 16 : 543-545.
- 中谷宗一・池田 勇・小林省蔵. 1980. 多胚性カンキツ品種の雑種獲得の効率化に関する研究 II ウンシュウミカンの胚数の系統間差異について. 果樹試報 E 3 : 15-23.
- 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. カンキツ新品種 '清見' について. 果樹試報. B 10 : 1-9.
- 生山 巖. 1981. カンキツ類の根端細胞における染色体の一観察法について. 果樹試報 D 3 : 1-7.
- 生山 巖・奥代直巳・高原利雄. 1982. カンキツ類の倍数性育種に関する研究 II $2x \times 4x$ の組合せにおいて出現する倍数体の種類及びその頻度について. 果樹試報 D 4 : 1-10.
- Oiyama I. and S. Kobayashi. 1990. Polyembryony in undeveloped monoembryonic diploid seeds crossed with a citrus tetraploid. HortScience 25 : 1276-1277.
- Oiyama I., S. Kobayashi, K. Yoshinaga, T. Ohgawara and S. Ishii. 1991. Use of pollen from somatic hybrid between *citrus* and *poncirus* in the production of triploids. HortScience 26 : 1082.
- 生山 巖. 1992. カンキツ類の倍数性育種に関する研究—主として四倍性育種素材の作出について. 果樹試報 特別報告第3号 41-48.
- 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 D 3 : 9-21.
- 奥代直巳・松本亮司・生山 巖・高原利雄・石内伝治・浅田謙介・村田広野. 1991. カンキツ新品種 '南香'. 果樹試報 20 : 71-77.
- Soost, R. K. and J. W. Cameron 1980. 'Oroblanco', a triploid pommelo-grapefruit hybrid. HortScience 15 : 667-669.
- Soost, R. K. and J. W. Cameron. 1985. 'Melogold', a triploid pommelo-grapefruit hybrid. HortScience 20 : 1134-1135.
- Starrantino, A. and G. R. Recupero. 1981. Citrus hybrids obtained from $2x$ female $\times$ $4x$ males. Proc. Intl. Soc. Citricult. 1 : 31-32.
- 立川忠夫・田中諭一郎・原 節夫. 1961. 柑橘の品種改良に関する研究 (I) 3 倍体柑橘の育成. 静岡柑試報 4 : 33-46.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18 : 6531-6535.