‘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 対合染色体と非還元配偶子の推定

楊 曉伶*・北島 宣**・長谷川耕二郎

高知大学農学部 783-8502 高知県南国市

Chromosome Pairing Set and the Presence of Unreduced Gametes Explain the Possible Origin of Polyploid Progenies from the Diploids ‘Tosa-Buntan’ × ‘Suisho-Buntan’ Pummelo

Xiaoling Yang*, Akira Kitajima** and Kojiro Hasegawa

Faculty of Agriculture, Kochi University, Nankoku, Kochi 783-8502

Summary

To clarify why polyploids were generated from the cross of the diploids ‘Tosa-Buntan’ and ‘Suisho-Buntan’ pummelo (*Citrus grandis* [L.] Osb.), the chromosome compositions of their di-, tri-, and tetraploid progenies, based on CMA staining, and their chromosome parings were observed.

1. Thirteen kinds of chromosome composition were manifested by 38 diploid seedlings indicating that the chromosome compositions of seedlings are highly variable.

2. Among the 13 kinds of diploid chromosome composition, the number of chromosome varied 1 to 3 in chromosome type-A, 0 to 1 in type-B, 3 to 5 in type-C, 2 to 4 in type-D, and 8 to 10 in type-E. The number of chromosome type-A varied 1 to 2 among the chromosome compositions with chromosome type-B. From these results, the pairing set of the chromosome type in ‘Tosa-Buntan’ was estimated as AB+CC+CC+CD+DE+EE+EE+EE+EE or AB+CC+CC+DD+CE+EE+EE+EE+EE.

3. Among six triploid seedlings, three kinds of chromosome composition exist which suggested that they resulted from unreduced female gamete at the first or second meiotic division, or unreduced male gamete at the second meiotic division.

4. Among three tetraploid seedlings, two kinds of chromosome composition exist. Because the chromosome compositions had two type-B chromosomes and an even number of chromosome of any other type, they probably resulted from the combination of an unreduced female with unreduced male gametes at the second meiotic division.

These results showed that the triploid seedlings from diploid ‘Tosa-Buntan’ × ‘Suisho-Buntan’ crossing also originated from an unreduced male gamete as well as from an unreduced female gamete.

Key Words: chromosome, citrus, pummelo, polyploid, unreduced gamete.

緒 言

カンキツでは二倍体間の交雑により得られた小粒種子から三倍体が出現することが知られている (Esen・Soost, 1971; Geraciら, 1975; 岩政・衛藤, 1976; 生山・奥代, 1983; 喜多ら, 1987; Toolapongら, 1996; 春崎ら, 1996). 筆者らは, 単胚性の二倍体である‘土佐文旦’と‘水晶文旦’との交雑で種子重 61~180 mg の不完全種子が

約 20% 出現し, 不完全種子からは三倍体が 6.3%, 四倍体が 2.3% 出現することを認めた (楊ら, 2000). しかし, 二倍体間の交雑で三倍体や四倍体の個体が出現する機構には不明な点が多い.

Befuら (2000) は, カンキツ染色体の識別にクロモマイシン A₃ (CMA) 染色が有効であり, CMA 分染パターンは A~E 型の 5 種類に分類されることを認め, ‘土佐文旦’の染色体構成は 1A+1B+5C+2D+9E であることを明らかにした. さらに, ‘水晶文旦’の染色体構成が 3A+3C+3D+9E であることを認め, CMA 染色による同型染色体が奇数で存在していることから, 異なる型の染色体が対合する可能性を示唆した (別府ら, 2001). また, カンキツ 10 種類の CMA 染色による染色体構成がいずれも異なることを明らかにした (Befuら, 2000; 別府ら,

2001年10月3日 受付. 2001年11月26日 受理.

*現在: 中国, 同済大学生命科学与医学工程学院

**Corresponding author.

本報告は園芸学会平成13年度秋季大会において発表した. また, 本研究の一部は日本学術振興会科学研究費 (No. 12660029) の助成によって行われた.

2001)が、染色体構成が異なるカンキツの交雑実生集団における染色体構成やその多様性については明らかではない。

本研究では、‘土佐文旦’と‘水晶文旦’との交雑実生集団における二倍体、三倍体および四倍体個体のCMA染色による染色体構成を明らかにし、‘土佐文旦’と‘水晶文旦’における染色体対合様式や配偶子の染色体構成を検討して、二倍体間の交雑から三倍体や四倍体が出現する機構を明らかにしようとした。

材料および方法

1996年から1998年に‘土佐文旦’を種子親として‘水晶文旦’花粉を交配し、得られた交雑実生のうち二倍体を38個体、三倍体を6個体および四倍体を3個体用いた。いずれも前報(楊ら, 2000)と同様に幼葉を採取して染色体標本作製し、ギムザ染色像を生物顕微鏡で写真撮影した後、ギムザ染色を脱染してCMA染色を行い、落射蛍光顕微鏡で検鏡して写真撮影した。

CMA分染パターンに基づく染色体の分類は、Befuら(2000)の方法に従って行った。すなわち、蛍光の強いCMA(+)領域が染色体の両端の端部および動原体付近にあるA型、一方の端部および動原体付近にあるB型、両端の端部にあるC型、一方の端部にあるD型、CMA(+)領域を持たないE型に分類した。写真撮影したギムザ染色像とCMA染色像をもとに、交雑実生個体の染色体構成を調査した。

結果および考察

CMA染色により、‘土佐文旦’と‘水晶文旦’との交雑実生個体の染色体構成を調査した結果、二倍体38個体で13種類の異なる染色体構成が認められた(第1図, 第2図, 第1表)。このうち、2本のA型染色体, 1本のB型染色体, 4本のC型染色体, 3本のD型染色体, 8本のE型染色体(2A+1B+4C+3D+8E)の染色体構成をもつものが7個体と最も多かった。また, 1A+1B+4C+3D+9E, 2A+1B+3C+4D+8E および 2A+1B+4C+2D+9E の染

Fig. 1. Photographs of chromosome from diploid, triploid and tetraploid hybrid seedling between ‘Tosa-Buntan’ and ‘Suisho-Buntan’ pummelo. A and B: $2n=2X=18$, C and D: $2n=3X=27$, E and F: $2n=4X=36$. A, C and E are Giemsa staining and B, D and F are CMA staining.

Fig. 2. Schematic representations of chromosome according to the position of CMA positive (CMA(+)) bands derived from the seedlings shown in Fig. 1. The black marks (■) indicate CMA(+) regions. Chromosome type-A has two terminal CMA(+) regions and a proximal one. Type-B has one terminal CMA(+) region and a proximal one. Type-C has two terminal CMA(+) regions. Type-D has one terminal CMA(+) region. Type-E has no CMA(+) region.

色体構成のものが5~6個体と比較的多く、染色体構成の出現には偏りがみられた。‘土佐文旦’の染色体構成は1A+1B+5C+2D+9Eであり、‘水晶文旦’は3A+3C+3D+9Eであることがすでに明らかにされている(Befuら, 2000; 別府ら, 2001)。このように、同型染色体が奇数で存在し、染色体構成の異なるカンキツの交雑において、得られた交雑実生個体は極めて多様な染色体構成を示すことが明らかとなった。また、交雑実生二倍体個体のうち、染色体構成が‘土佐文旦’と一致するものが

3個体、‘水晶文旦’と一致するものが1個体と少なく、母樹の染色体を解析するためには、本研究で用いた幼葉などの栄養器官を材料に染色体標本を作製する必要があると考えられた。

交雑実生二倍体における各染色体型の出現数の範囲についてみると、A型染色体は‘土佐文旦’で1本、‘水晶文旦’で3本あり、‘水晶文旦’の3本のうち2本が対合していると仮定すると、交雑実生二倍体におけるA型染色体の理論的な出現数の範囲は1~3本となる。このように、各染色体型について偶数の同型染色体が対合すると仮定したときの交雑実生二倍体における出現数の理論値と本研究において出現した実際値とを第2表に示した。その結果、A, B, C, E型染色体は理論値と実際値が一致し、‘土佐文旦’では5本のC型染色体のうち4本が2対に、9本のE型染色体のうち8本が4対に対合しており、‘水晶文旦’ではA型とC型染色体は3本のうち2本が1対に、9本のE型染色体のうち8本が4対に対合しているものと考えられた。しかし、D型染色体では理論値が2~3本であるのに対し、実際には2~4本出現した。このことから、‘土佐文旦’の2本のD型染色体がいずれも異型対合しているか、‘水晶文旦’の3本のD型染色体がいずれも異型対合しているかのどちらかであると考えられた。次に、‘土佐文旦’の1本のB型染色体に注目し、これがどの型の染色体と対合しているかを検討した。すなわち、ある染色体型がB型染色体と対合していると仮定すると、その染色体型の出現数の最大値は、B型染色体をもつ交雑実生二倍体において前述の理論値より1本少なくなる。ただし、D型染色体がB型染色体と異型対合している場合は1~3本となる。そこで、B型染色体をもつ交雑実生二倍体において、各染色体型がB型染色体と対合すると仮定したときの理論値と実際値を比較すると、A型染色体だけが一致し(第2表)、‘土佐文旦’のB型染色体はA型染色体と対合していると考えられた。これらのことから、‘土佐文旦’染色体

Table 1. Chromosome composition based on CMA banding pattern of diploid seedlings from ‘Tosa-Buntan’ × ‘Suisho-Buntan’ pummelo.

Parent and progeny	Chromosome composition ^z	No. of seedling
‘Tosa-Buntan’ ^y	1A+1B+5C+2D+9E	
‘Suisho-Buntan’ ^y	3A+3C+3D+9E	
Diploid seedling	2A+1B+4C+3D+8E	7
	1A+1B+4C+3D+9E	6
	2A+1B+3C+4D+8E	5
	2A+1B+4C+2D+9E	5
	1A+1B+5C+2D+9E	3
	1A+1B+4C+4D+8E	2
	1A+1B+5C+3C+8E	2
	2A+1B+3C+3D+9E	2
	2A+4C+2D+10E	2
	2A+1B+3C+2D+10E	1
	2A+5C+3D+8E	1
	3A+4C+2D+9E	1
	3A+3C+3D+9E	1

^z See Fig. 2.

^y ‘Tosa-Buntan’ and ‘Suisho-Buntan’ are seed parent and pollen parent, respectively. Their chromosome compositions are based on Befu et. al. (2000, 2001).

Table 2. Expected and actual values in each type of chromosome number among diploid seedlings from ‘Tosa-Buntan’ × ‘Suisho-Buntan’ pummelo.

Type of chromosome ^z	Chromosome number of parents ^y		Range of chromosome number in diploid seedlings			
	‘Tosa-Buntan’	‘Suisho-Buntan’	Whole seedlings		Seedlings with type-B chromosome	
			Expected ^x	Practical	Expected ^w	Practical
A	1	3	1-3	1-3	1-2	1-2
B	1	0	0-1	0-1	-	-
C	5	3	3-5	3-5	3-4	3-5
D	2	3	2-3	2-4	1-3	2-4
E	9	9	8-10	8-10	8-9	8-10

^z See Fig. 2.

^y See Table 1.

^x Values based on the assumption of paring in even number of same type chromosome.

^w Values in the case of paring with type-B chromosome.

Table 3. Possible chromosome composition of ‘Tosa–Buntan’ gamete based on the estimated chromosome pairing.

	Estimated chromosome pairing	
	AB+CC+CC+CD+DE+EE+EE+EE+EE	AB+CC+CC+DD+DE+EE+EE+EE+EE
Chromosome composition ^z of gamete	1A+3C+1D+4E	1A+3C+1D+4E
	1A+3C+5E	
	1A+2C+2D+4E	
	1A+2C+1D+5E	1A+2C+1D+5E
	1B+3C+1D+4E	1B+3C+1D+4E
	1B+3C+5E	
	1B+2C+2D+4E	
	1B+2C+1D+5E	1B+2C+1D+5E

^z See Fig. 2.**Table 4.** Chromosome composition of triploid and tetraploid seedlings from ‘Tosa–Buntan’ × ‘Suisho–Buntan’ pummelo and possible gametic chromosome composition of the parents.

Chromosome number (2n)	Chromosome composition ^z of seedling	No. of seedling	Possible chromosome composition of gamete		Unreduced gamete ^y	Unreduced division ^x
			‘Tosa–Buntan’	‘Suisho–Buntan’		
27	2A+1B+7C+3D+14E	3	1A+1B+5C+2D+9E 1B+3C+1D+4E	1A+2C+1D+5E 2 (1A+2C+1D+5E)	F M	I II
27	2A+1B+7C+4D+13E	2	1A+1B+5C+2D+9E 1B+3C+5E	1A+2C+2D+4E 2 (1A+2C+2D+4E)	F M	I II
27	2A+2B+6C+3D+14E	1	2 (1B+2C+1D+5E)	2A+2C+1D+4E	F	II
36	2A+2B+8C+4D+20E	2	2 (1B+2C+1D+5E) 2 (1B+3C+5E)	2 (1A+2C+1D+5E) 2 (1A+1C+2D+5E)	F・M F・M	II II
36	4A+2B+6C+6D+18E	1	2 (1B+2C+1D+5E) 2 (1B+2C+2D+4E)	2 (2A+1C+2D+4E) 2 (2A+1C+1D+5E)	F・M F・M	II II

^z See Fig. 2.^y F : female, M : male, F・M : female and male.^x I : Unreduced first meiotic division, II : Unreduced second meiotic division.

の対合様式は、AB+CC+CC+CD+DE+EE+EE+EE+EE または AB+CC+CC+DD+CE+EE+EE+EE+EE と推定された。また、配偶子の染色体構成は、前者で8種類、後者で4種類が推定され、後者の4種類はいずれも前者の8種類に含まれた(第3表)。

‘水晶文旦’では、偶数の同型染色体が対合すると仮定したときの染色体対合様式は3種類が推定され、3本のD型染色体がすべて異型対合している場合は1種類が推定されるにとどまった。

二倍体間の交雑における三倍体の出現には、非還元配偶子が関与しており、非還元配偶子は減数分裂の退行現象によって生じると考えられている。退行現象が減数第I分裂中期に生じると減数第I分裂が行われずに非還元となり、第II分裂に移行するので体細胞と同じ染色体構成をもつ非還元配偶子が2分子形成されることになる。退行現象が減数第I分裂後の後期に生じると第II分裂が行われずに非還元となり、偶数の染色体構成をもつ異な

る非還元配偶子が1分子ずつ形成されることになる。

本研究における交雑実生三倍体の6個体では、染色体構成が2A+1B+7C+3D+14Eは3個体、2A+1B+7C+4D+13Eは2個体および2A+2B+6C+3D+14Eは1個体出現した(第1図、第2図、第4表)。これらの個体において、‘土佐文旦’雌性配偶子の非還元が減数第I分裂で生じ、体細胞と同じ1A+1B+5C+2D+9Eの染色体構成をもつ非還元雌性配偶子に由来する可能性について検討した。染色体構成が2A+1B+7C+3D+14Eおよび2A+1B+7C+4D+13Eの個体では、雄性配偶子の染色体構成がそれぞれ1A+2C+1D+5Eおよび1A+2C+2D+4Eと推定され、‘水晶文旦’の雄性配偶子として出現可能と考えられることから、これらの三倍体は‘土佐文旦’の減数第I分裂の非還元による非還元雌性配偶子由来の可能性が示唆された。しかし、2A+2B+6C+3D+14Eの個体では1本のB型染色体が雄性配偶子由来となるが、‘水晶文旦’の雄性配偶子として出現しないことから、減数第I分裂の非還元による

よるものではないと考えられた。また、‘水晶文旦’ 雄性配偶子の非還元が減数第 I 分裂で生じた場合、体細胞と同じ $3A+3C+3D+9E$ の染色体構成をもつ非還元雄性配偶子が関与するが、得られた交雑三倍体実生の A 型染色体はいずれも 2 本であることから、‘水晶文旦’ 雄性配偶子の減数第 I 分裂における非還元起因していないと考えられた。

次に、本研究で得られた交雑実生三倍体において、退化現象が減数第 I 分裂後に生じて第 II 分裂が非還元となり、偶数の染色体構成をもつ非還元配偶子が形成される場合について検討した。1 本の B 型染色体をもつ三倍体個体は‘土佐文旦’の還元雌性配偶子と‘水晶文旦’の非還元雄性配偶子の組み合わせに起因し、2 本の B 型染色体をもつ三倍体は‘土佐文旦’の非還元雌性配偶子と‘水晶文旦’の還元雄性配偶子の組み合わせに起因すると考えられた。‘土佐文旦’における染色体対合様式の推定に基づく配偶子の染色体構成から、染色体構成が $2A+1B+7C+3D+14E$ および $2A+1B+7C+4D+13E$ の三倍体では、それぞれ‘土佐文旦’由来の還元雌性配偶子は $1B+3C+1D+4E$ および $1B+3C+5E$ 、‘水晶文旦’由来の非還元雄性配偶子は $2(1A+2C+1D+5E)$ および $2(1A+2C+2D+4E)$ と推定された。染色体構成が $2A+2B+6C+3D+14E$ の三倍体では、‘土佐文旦’由来の非還元雌性配偶子は $2(1B+2C+1D+5E)$ 、‘水晶文旦’由来の還元雄性配偶子は $2A+2C+1D+4E$ と推定された。このように、二倍体間の交雑で三倍体が出現するのは、減数第 II 分裂の非還元による非還元雌性配偶子や非還元雄性配偶子に由来する可能性も示唆された。

交雑実生四倍体の 3 個体では、染色体構成は 2 個体が $2A+2B+8C+4D+20E$ 、1 個体が $4A+2B+6C+6D+18E$ であった (第 1, 2 図, 第 4 表)。カンキツでは、二倍体から生じる四倍体実生は珠心胚由来の場合も考えられている (Cameron・Frost, 1968) が、本研究で得られた四倍体は‘土佐文旦’体細胞の倍化に由来しているものではなかった。これらはいずれも B 型染色体を 2 本もつことと、いずれの染色体型も偶数存在することから、‘土佐文旦’雌性配偶子と‘水晶文旦’雄性配偶子はいずれも第 II 分裂の非還元により、種々の染色体構成をもつ非還元配偶子が形成されたものと考えられた。‘土佐文旦’配偶子の染色体構成の推定から、染色体構成が $2A+2B+8C+4D+20E$ の四倍体では、‘土佐文旦’由来の非還元雌性配偶子は $2(1B+2C+1D+5E)$ 、‘水晶文旦’由来の非還元雄性配偶子は $2(1A+2C+1D+5E)$ の場合や‘土佐文旦’由来の非還元雌性配偶子は $2(1B+3C+5E)$ 、‘水晶文旦’由来の非還元雄性配偶子は $2(1A+1C+2D+5E)$ の場合が推定された。染色体構成が $4A+2B+6C+6D+18E$ の四倍体では、‘土佐文旦’由来の非還元雌性配偶子は $2(1B+2C+1D+5E)$ 、‘水晶文旦’由来の非還元雄性配偶子は $2(2A+1C+2D+4E)$ の場合や‘土佐文旦’由来の非還元雌性配偶子は

$2(1B+2C+2D+4E)$ 、‘水晶文旦’由来の非還元雄性配偶子は $2(2A+1C+1D+5E)$ の場合が推定された。

Esen ら (Esen・Soost, 1972, 1973; Geraci ら, 1973; Esen ら, 1978) はカンキツを用いた一連の研究において、種子親の違いによって倍数性の異なる後代の出現が大きく変動することから、カンキツの二倍体間の交雑で三倍体が出現するのは非還元雌性配偶子に起因すると結論づけている。しかし、生山・奥代 (1983) は、スイートオレンジを種子親とする二倍体間の交雑では三倍体の出現が花粉親の違いによって大きく異なることを認めており、非還元雄性配偶子が関与している可能性を示している。本研究において、交雑実生三倍体と四倍体の CMA 染色による染色体構成の結果から、‘土佐文旦’と‘水晶文旦’の二倍体間の交雑により生じた三倍体は、非還元雌性配偶子に起因する場合と非還元雄性配偶子に起因する場合のどちらも存在すると考えられた。

摘 要

‘土佐文旦’×‘水晶文旦’の交雑実生二倍体、三倍体および四倍体個体群について、CMA 染色による染色体構成を明らかにし、染色体対合様式や二倍体間の交雑で三倍体や四倍体出現する機構を検討した。

1. 交雑実生二倍体 38 個体では CMA 染色により 13 種類の異なる染色体構成が認められ、交雑実生個体は極めて多様な染色体構成を示すことが明らかとなった。

2. 交雑実生二倍体の染色体構成において、A 型染色体は 1~3 本、B 型染色体は 0~1 本、C 型染色体は 3~5 本、D 型染色体は 2~4 本、E 型染色体は 8~10 本の範囲で出現した。また、B 型染色体をもつ個体では A 型染色体が 1~2 本の範囲で出現した。これらのことから、‘土佐文旦’染色体の対合様式は、 $AB+CC+CC+CD+DE+EE+EE+EE+EE$ または $AB+CC+CC+DD+CE+EE+EE+EE+EE$ と推定された。

3. 交雑実生三倍体では 6 個体で 3 種類の異なる染色体構成が出現した。これらの染色体構成は、減数第 I 分裂または第 II 分裂の非還元による非還元雌性配偶子に起因しているか、減数第 II 分裂の非還元による非還元雄性配偶子に起因している可能性が示唆された。

4. 交雑実生四倍体では 3 個体で 2 種類の異なる染色体構成が出現した。これらは B 型染色体を 2 本もち、いずれの染色体型も偶数存在することから、雌性配偶子、雄性配偶子ともに減数第 II 分裂の非還元起因すると考えられた。

これらのことから、‘土佐文旦’×‘水晶文旦’の二倍体間の交雑で三倍体出現するのは、非還元雌性配偶子に起因する場合と非還元雄性配偶子に起因する場合のどちらも存在すると考えられた。

引用文献

- 別府まゆみ・北島 宣・長谷川耕二郎. 2001. クロモマイン A_3 (CMA) 染色の分染パターンに基づく数種カンキツの染色体構成. 園学雑. 70: 83-88.
- Befu, M., A. Kitajima, X. Yang and K. Hasegawa. 2000. Classification of 'Tosa-Buntan' pummelo (*Citrus grandis* [L.] Osb.), 'Washington' navel orange (*Citrus sinensis* [L.] Osb.) and trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* [L.] Raf.) chromosomes using young leaves. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 69:22-28.
- Cameron, J. and H. Frost. 1968. Genetics, breeding and nucellar embryony. p. 325-370. In: W. Reuther, L. Batchelor and H. Webber (eds.), The Citrus Industry. Vol. II. Univ. California Press, California.
- Esen, A. and R. Soost. 1971. Unexpected triploids in *Citrus*: their origin, identification and possible use. J. Hered. 62: 329-333.
- Esen, A. and R. Soost. 1972. Tetraploids progenies from $2x \times 4x$ crosses and their origin. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 97: 410-414.
- Esen, A. and R. Soost. 1973. Seed development in citrus with special reference to $2x \times 4x$ crosses. Amer. J. Bot. 60: 448-462.
- Esen, A., R. Soost and G. Geraci. 1978. Seed set, size and development after $4x \times 2x$ and $4x \times 4x$ crosses in citrus. Euphytica 27: 283-294.
- Geraci, G., A. Esen and R. K. Soost. 1975. Triploid progenies from $2x \times 2x$ crosses of citrus cultivars. J. Hered. 66: 177-178.
- 春崎聖一・国武久登・小松春喜. 1996. 単胚性カンキツにおける小粒種子の3倍体および半数体の発生. 園学雑. 65(別2): 90-91.
- 岩政正男・衛藤徹雄. 1976. カンキツ類実生に発生する3倍体. 第1報. 園学要旨. 昭51春: 92-93.
- 喜多景治・佐川正典・窪田聖一・松本英紀. 1987. 3倍体利用によるカンキツ類の無核品種育成に関する研究. 園学要旨. 昭62春. 6-7.
- 生山 巖・奥代直巳. 1983. カンキツ類の倍数性育種に関する研究Ⅲ. $2x$ スイートオレンジ $\times 2x$ の組み合わせにおける3倍体の出現について. 果樹試報 D 5: 1-18.
- 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.
- 楊 曉伶・北島 宣・別府まゆみ・長谷川耕二郎. 2000. '土佐文旦' と '水晶文旦' との交雑実生における染色体数の変異. 園学雑. 69: 308-314.