ノート

[*Nippon Nōgeikagaku Kaishi*
Vol. 71, No. 12, pp. 1279~1282, 1997]

幼苗期の葉油成分による
カンキツ珠心胚実生と交雑実生の識別

坂本宏司, 井上敦彦, 中谷宗一*,
河塚 寛**, 太田英明***, 箴島 豊****

(広島県立食品工業技術センター,

*広島県立農業技術センター,

**広島文教女子大学短期大学部,

中村学園大学, *九州大学農学部)

平成9年6月30日受理

Identification of Hybrid and Nucellar
Citrus Seedlings at the Seedling Stage by
Leaf Oil Compounds

Koji SAKAMOTO, Atsuhiko INOUE, Muneichi
NAKATANI*, Hiroshi KOZUKA**,
Hideaki OHTA***, and Yutaka OSAJIMA****

*Hiroshima Prefectural Food
Technological Research Center,
12-70 Hijiya-honmachi, Minami-ku,
Hiroshima 732*

**Fruit Tree Research Institute,
Hiroshima Prefectural Agricultural Research Center,
2835 Mitsu, Akitsu-cho, Toyota-gun,
Hiroshima-ken 729-24*

***Hiroshima Bunkyo Women's College,
1-2-1 Kabehigashi, Asakita-ku,
Hiroshima 731-02*

****Department of Food and Nutrition,
Nakamura Gakuen University,
5-7-1 Befu, Jonan-ku, Fukuoka 814-01*

*****Department of Food Science and Technology,
Faculty of Agriculture, Kyushu University,
6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka-shi 812*

Seventy-five compounds in citrus leaf oils at an early seedling stage were detected by a capillary gas chromatograph-mass spectrometer. Thirty-six of sixty-two seedlings were identified for the hybrid seedlings by the characteristics of the leaves and a principal component analysis(PCA) using the leaf

oil compounds as variables. Eighteen of the extracted compounds contributed highly to the identification of the nucellar and hybrid seedlings by PCA. Five compounds, *cis*-linalool oxide, α -copaene, decanal, β -cubebene, and Germacrene D, were important for distinguishing the hybrids by a step-wise discriminant analysis.

(Received June 30, 1997)

Key words : citrus hybrid ; leaf oil ; nucellar seedling ; hybrid seedling

温州ミカンなどの多胚性カンキツ類を種子親として用いた交雑では、雑種獲得率の低さ⁽¹⁾が育種上の大きな支障となっている。そこで、交雑育種の効率化を図るため、珠心胚実生と交雑実生の識別法が研究されてきた⁽²⁻⁸⁾。簡易な識別法として、葉の形態特性による方法⁽²⁾があるが、より信頼性の高い識別を行うためには、客観的な分析結果に基づく識別法を用いる必要がある。とりわけ、葉油のガスクロマトグラムパターンによる交雑実生の識別法⁽⁸⁾は、信頼性の面から有用な方法と思われるが、葉油は多くの成分で構成されており、識別作業には多大な労力を必要とする。したがって、識別に必要な葉油成分のみを解析の対象にした方がより効率的な識別が行える。また、識別は、播種後間もない幼苗期の時期に識別を行う必要があるが、この時期の実生の葉油を用いて識別精度を調べた報告は見当たらない。本報告では、温州ミカンを種子親として交配し、得られた幼苗期の実生について、葉油成分を用いて珠心胚実生と交雑実生の識別を行うとともに、これらの識別に関与する葉油成分の検討を試みた。

1993年に広島県立農業技術センター果樹研究所において、'今村温州'を種子親として、オレンジ('ハムリン'、'ジャッファオレンジ')、ブンタン、ポンカンおよび温州ミカンとポンカンの交雑品種である'早香'の5点の花粉を交配して得た種子を翌年1月に播種し、62個体(No.1~No.62)の実生を育成した。これら実生の葉の採取は、播種した年の11月に行った。

また、種子親として用いた'今村温州'(No.69)および'瀬戸温州'(No.70)、'興津早生'(No.71)、'大津4号'(No.72)の温州ミカン4個体と花粉親として用いた'ハムリン'(No.73)、'ジャッファオレンジ'(No.74)、'早香'(No.75)、文旦(No.76)、ポンカン(No.77)の5個体と前報⁽⁹⁾で用いた'瀬戸温州'×'森田ポンカン'交雑実生(No.63-No.68)6個体の葉も同時に採取し

Fig. Scatter Diagram from a Principal Component Analysis Based on the Percentages of the Leaf Oils.

● : Nucellar Seedling ○ : Hybrid Seedling
 ■ : Seed Parent (Satsuma mandarin) □ : Pollen Parent

分析に供した。これらは、いずれもすでに結果期に達した成木である。

葉 10 g を液体窒素で凍結粉碎した後、800 ml の蒸留水に葉粉末を懸濁させ、減圧下で連続水蒸気蒸留抽出 (Simultaneous Distillation and Extraction = SDE) を行った。蒸留後、抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水し、40°C 以下で溶媒を除去して、葉油濃縮液を得た。葉油濃縮液はそのままガスクロマトグラフィー質量分析 (GC-MS) に供した。減圧 SDE 法、GC-MS 条件および成分の同定または推定法は、既報⁽⁹⁾ のとおりである。また、主成分分析および判別分析には、Statistica ver. 4.5 (Stat Soft 社製) を用いた。主成分分析は相関行列に基づいて行った。

GC-MS による葉油分析の結果、75 成分を検出し、70 成分を同定または推定した。まず最初に、葉油組成や葉の形態特性を各個体ごと詳細に比較し、珠心胚実生と交雑実生の識別を行った。その結果、幼苗期の実生 62 個体のうち、26, 36 個体をそれぞれ珠心胚実生または交雑実生であると推定した。そこで、75 個の葉油成分を用いて、77 サンプルについて主成分分析を行い、得られた第 1 および第 2 主成分スコアをプロットした

結果を Fig. に示した。第 1 および第 2 主成分の寄与率は、それぞれ 19.0%, 11.2% であった。Fig. をみると、珠心胚実生 (No. 1 ~ No. 26) はすべて第 3 象限に分布していたのに対し、交雑実生 (No. 27 ~ No. 68) と花粉親 (No. 73 ~ No. 77) は、主として第 1, 第 4 象限の広い範囲に、また、種子親である「今村温州」およびその他の温州ミカン、は、第 2 象限に分布していた。第 1 主成分軸上で、珠心胚実生と種子親は、負の位置に、大部分の交雑実生と花粉親は正の位置に分布していたことから、第 1 主成分は、珠心胚実生と交雑実生の識別を表す総合特性値であると解釈できる。ただし、珠心胚実生と交雑実生の各グループは、第 1 主成分により完全に分離されたわけではなく、各実生は連続的な分布をしており、交雑実生の一部は、第 1 主成分軸の負の部分に位置していた。このように、主成分分析を用いた解析のみでは、識別が極めて困難な実生も存在しており、葉油成分の遺伝様式の多様さがうかがえる。また、これまでの研究から、葉油成分の季節変動は少ないものの⁽¹⁰⁾、葉油試料の採取には、樹齢や栽培条件に注意を払う必要性が指摘されている⁽¹¹⁾。しかし、「瀬戸温州」×「森田ボンカン」交雑実生の分布位置から明らか

のように、樹齢による葉油成分の違いは、主成分分析による交雑実生の識別に全く影響を及ぼさなかった。識別手法の信頼性を実証するには、結果期に達するまでの長い年月を必要とするが、62 個体中 39 個体は、主成分分析の結果からも交雑実生である可能性が極めて高いことが示された。また、珠心胚実生は、遺伝的には同一と考えられる種子親およびその他の温州ミカンと異なる位置に分布していた。表には示していないが、種子親やその他の温州ミカンの葉油に比べ、幼苗期の実生の葉油では、*d*-リモネンの組成比が高く、逆に、(*E*)-2-ヘキセナールの組成比が低い傾向が認められた。既に結果期に達した実生である‘瀬戸温州’×‘森田ボンカン’の交雑実生においても同様の傾向が認められたことから、この違いは、樹齢差によるものである。

次に、第 1 主成分と各変数の相関を表す因子負荷量の絶対値が 0.6 以上を示した 18 成分の組成比の平均値と標準偏差を Table に示した。t-検定の結果、18 成分すべてにおいて、珠心胚実生と交雑実生間で有意な差が認められた。珠心胚実生と交雑実生間の検出の有無

をみると、 α -フェランドレン、シス-リナロールオキサイド (2-Hydroxyisopropyl-5-methyl-5-vinyl-tetrahydrofuran)、 α -コパエン、 β -キューベベン の 4 成分は、大部分の珠心胚実生で検出されたが、交雑実生では不検出または微量検出のものが多く、また、花粉親でも同様であった。したがって、この 4 成分は、幼苗期の交雑実生を識別する指標として極めて有用と思われる。また、 α -フェランドレンとシス-リナロールオキサイドは、種子親その他の温州ミカンでは検出されなかったことから、幼苗期特有の葉油成分とも考えられる。 γ -テルピネン、 β -エレメンや花粉親特有の成分である α -シネンサール、 β -ファルネセンなど比較的組成比の高い成分のみですべてを識別することは極めて困難であったが、微量成分ではあるが、上記 4 成分を用いると容易に識別できた。

そこで、変数減少法によるステップワイズ判別分析を行い、判別に強く寄与する成分の抽出を行った。判別分析には、交雑実生グループの分散がゼロの α -フェランドレンを除く 17 成分を用いた。その結果、シス-

Table Statistical Data of Percentages of Compounds That Had Factor Loadings of not Less Than ± 0.6 on the First Principal Component Axis.

Compounds	Nucellar seedlings	Hybrid seedlings	Satsuma mandarin	Pollen parents	Kovats index
	No.1-No.26	No.27-No.68	No.69-No.72	No.73-No.77	
α -Pinene	1.35 $\pm$ 0.43	0.84 $\pm$ 0.63	1.12 $\pm$ 0.10	0.58 $\pm$ 0.35	1025
α -Thujene	0.70 $\pm$ 0.25	0.37 $\pm$ 0.40	0.59 $\pm$ 0.08	0.16 $\pm$ 0.16	1029
α -Phellandrene(T)	0.34 $\pm$ 0.21	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	1170
γ -Terpinene	13.3 $\pm$ 2.33	6.56 $\pm$ 7.37	13.3 $\pm$ 0.97	3.16 $\pm$ 6.27	1255
<i>p</i> -Cymene	7.73 $\pm$ 1.73	3.60 $\pm$ 4.38	8.46 $\pm$ 0.66	0.40 $\pm$ 0.60	1277
Terpinolene	1.35 $\pm$ 0.51	0.47 $\pm$ 0.54	0.87 $\pm$ 0.10	0.43 $\pm$ 0.34	1288
Octanal	0.80 $\pm$ 0.37	0.20 $\pm$ 0.22	0.27 $\pm$ 0.25	0.03 $\pm$ 0.08	1290
<i>cis</i> -Linalool oxide	0.26 $\pm$ 0.15	0.02 $\pm$ 0.03	0.00 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.02	1448
α -Copaene	0.24 $\pm$ 0.07	0.05 $\pm$ 0.08	0.05 $\pm$ 0.11	0.00 $\pm$ 0.00	1500
Decanal	0.76 $\pm$ 0.20	0.22 $\pm$ 0.23	0.21 $\pm$ 0.13	0.09 $\pm$ 0.13	1501
β -Cubebene	0.30 $\pm$ 0.06	0.05 $\pm$ 0.08	0.15 $\pm$ 0.10	0.00 $\pm$ 0.00	1548
<i>cis</i> -Sabinene hydrate	0.41 $\pm$ 0.16	0.19 $\pm$ 0.20	0.09 $\pm$ 0.06	0.18 $\pm$ 0.13	1554
1-Octanol	0.54 $\pm$ 0.24	0.12 $\pm$ 0.19	0.09 $\pm$ 0.08	0.04 $\pm$ 0.05	1560
β -Elemene	4.74 $\pm$ 1.28	1.82 $\pm$ 2.03	5.04 $\pm$ 0.65	1.91 $\pm$ 0.65	1599
α -Caryophyllene	2.35 $\pm$ 0.45	1.17 $\pm$ 0.57	2.61 $\pm$ 0.48	0.79 $\pm$ 0.39	1685
α -Terpineol	1.83 $\pm$ 0.58	1.00 $\pm$ 0.75	0.69 $\pm$ 0.25	0.73 $\pm$ 0.21	1702
Germacrene D	0.49 $\pm$ 0.28	0.22 $\pm$ 0.28	0.32 $\pm$ 0.09	0.10 $\pm$ 0.13	1718
δ -Cadinene(T)	0.57 $\pm$ 0.19	0.27 $\pm$ 0.23	0.44 $\pm$ 0.06	0.14 $\pm$ 0.17	1770

(T) ; Tentative compound, Data ; Mean $\pm$ S. D.

All means for the nucellar seedling group are significantly different at $p < 0.01$ from those of the hybrid seedling group, as measured by Student's t-test.

リナロールオキサイド, α -コパエン, デカナール, β -キューベベン, ゲルマクレン D の 5 成分を用いた判別式によって 98.5% (68 個体中間違いは 1 個体のみ) の確率で珠心胚実生と交雑実生を識別できた。この判別関数のウィルキスの γ , F 値, p 値は, それぞれ 0.107, 103.1, $p < 0.0001$ で, 判別能力は高度に有意であった。

以上の結果, 葉油成分による交雑実生の識別法は, 幼苗期の実生においても信頼性が高いこと, また, オレンジ類, プンタン, ポンカンを花粉親とし, 温州ミカンを種子親として交配し, 得られた幼苗期の実生について, 少数の葉油成分で交雑実生を識別するには, 比較的組成比の低い成分を用いる必要があることが認められた。葉油成分による識別法に, 葉の形態特性による簡易な識別法を補完的に用いることにより, 極めて信頼性の高い識別が可能である。

- (1) 西浦昌男, 岩崎藤助: 園試報, **B 3**, 1-10 (1964).
- (2) 堀内昭作, 湯田英二, 中川昭一, 森本純平, 我籐雄: 園学雑, **59**, 225-235 (1990).
- (3) J. R. Furr and P. C. Reece: *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **48**, 141-146 (1946).
- (4) M. Nishiura, S. Kamiya, and S. Esaki: *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 1691-1706 (1971).
- (5) 上野 勇, 西浦昌男: 果樹試報, **B 3**, 1-8 (1976).
- (6) A. P. Pieringer and G. J. Edwards, and R. W. Wolford: *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **84**, 204-212 (1964).
- (7) 上野 勇, 平井正志: 果樹試報, **B 10**, 35-49 (1983).
- (8) 池田 勇: 果樹試報, **E 1**, 11-36 (1976).
- (9) 坂本宏司, 井上敦彦, 吉和哲朗, 守本京三, 中谷宗一, 河塚 寛: 農化, **68**, 815-820 (1994).
- (10) J. A. Attaway, A. P. Pieringer, and L. J. Barabas: *Phytochemistry*, **5**, 141-151 (1966).
- (11) R. W. Scora and S. Torrissi: *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **88**, 262-271 (1966).