

多胚性カンキツの胚数およびその雑種実生出現

山本雅史^{1*}・伊東孝峻¹・川口昭二^{2a}・野村哲也^{2b}・福留弘康²・勘米良祥多^{2c}

¹鹿児島大学農学部果樹園芸学研究室 〒890-0065 鹿児島市郡元

²鹿児島大学農学部附属農場唐湊果樹園 〒890-0081 鹿児島市唐湊

Number of Embryos and Emergence of Hybrid Seedlings in Polyembryonic Citrus

YAMAMOTO Masashi^{1*}, ITO Takatoshi¹, KAWAGUCHI Shoji^{2a}, NOMURA Tetsuya^{2b}, FUKUDOME Hiroyasu²
and KANMERA Shota^{2c}

¹Laboratory of Fruit Science, Faculty of Agriculture, Kagoshima University, Korimoto, Kagoshima,
Kagoshima 890-0065

²Toso Orchard, Experimental Farm, Faculty of Agriculture, Kagoshima University, Toso, Kagoshima,
Kagoshima 890-0081

Summary

The number of embryos per seed was counted in 13 local citrus accessions distributed in Kagoshima, Japan. Kawabata Mikan and Usukawa (Kishu Mikan) showed monoembryony and the remaining 11 accessions showed polyembryony. Among the polyembryonic accessions, Hetsuka Daidai and Kimikan showed the lowest (1.4) and highest (41.4) number of embryos per seed, respectively. Next, the relationship between the number of embryos per seed and percentage of hybrid seedlings that emerged was investigated. Six polyembryonic accessions and monoembryonic Sakurajima Komikan were used as the seed parents. Their number of embryos per seed ranged from one to 35. 'Mato Anyu' was used as the pollen parent in all cross combinations. The percentage of emerged hybrid seedlings became low when the number of embryos per seed in the seed parent increased. When the number of embryos per seed of a seed parent was around eight, approximately 20% of seedlings were hybrids. However, when the number of embryos was 25 or more, hybrids hardly appeared.

Key words: Isozyme, monoembryony, nucellar embryo, polyembryony

キーワード: アイソザイム, 多胚性, 単胚性, 珠心胚

緒 言

カンキツは北緯40度から南緯40度におよぶ温帯, 亜熱帯および熱帯地域で栽培されており, 統計上世界で最も生産量の多い果樹の一つである。わが国でも温暖地, 暖地および亜熱帯地域における重要な果樹である。世界的にはスイートオレンジおよびグレープフルーツ等, 日本ではウンシュウミカンが主要であるが, 近年, '不知火' (松本, 2001) のように交雑によって育成された品種の重要性が高まっている。

カンキツには多胚性として知られる無性生殖を示すものが多く存在するため, 多胚性品種を種子親にした場合, 種子親のクローンである珠心胚実生の出現が多く, 雑種実生の獲得が困難なことが多い (西浦・岩崎, 1964)。多胚性種子の胚数は種類によって大きく異なり (上野ら, 1967), 胚数と雑種実生出現率との関係には負

の関係があることがわかっている (奥代ら, 1981)。当然のことながら, 単胚性種子から得られる実生はすべて雑種である。そのため, 育種利用を考える場合, それぞれの品種系統の胚数を知ることは極めて重要である。したがって, 既存主要品種系統の胚数については詳細な報告がある (奥代ら, 1981; 上野ら, 1967)。

筆者らは奄美群島を含む鹿児島県在来カンキツの収集保存に取り組んでいる (山本ら, 2006; 2021)。今後, これらを育種素材として活用する場合, 胚数の情報があることが望ましい。一方, カンキツ類においては, 多胚性種子から遺伝的に均一な種子親のクローンが作出できることから, それを台木繁殖に利用している。すなわち, 台木として利用するためには雑種実生の出現率が低くなる胚数の多いものが望まれる。南西諸島原産のカンキツではシクワサー以外にも台木として注目されているものもある (園田ら, 2014)。このようなことから収集系統の胚数を調査することは重要な課題である。

また, 前述の通り胚数が雑種実生出現率に影響を及ぼすことは認められているが (奥代ら, 1981), 胚数の少ないものから多いものまでを供試して両者の関係を検討した例は見当たらない。本研究では単胚性から多胚性で胚数の多いものまでを種子親とした組み合わせを用いて,

2022年8月18日 受付日

2022年11月24日 受理日

*Corresponding author. E-mail: yamasa@agri.kagoshima-u.ac.jp

^a 退職

^b 現 鹿児島大学農学部附属農場学内農事部

^c 現 鹿児島大学農学部附属農場指宿植物試験場

胚数と雑種実生出現率との関係も検討した。

以上について研究を実施したところ若干の知見が得られたので、以下に報告する。

材料および方法

鹿児島県本土、屋久島および奄美群島在来カンキツの胚数

現地調査等で収集し、鹿児島大学農学部附属農場唐湊果樹園（鹿児島市）においてカラタチ台木で露地栽培している保存樹を供試した。内訳は鹿児島県本土の3系統、屋久島の1系統、九州から奄美群島に分布する1系統、喜界島の4系統、加計呂麻島の1系統および徳之島の3系統である（Table 1）。なお、ケラジ（諸鈍）は加計呂麻島諸鈍でケラジと呼ばれているカンキツであるが、喜界島原産の一般的なケラジ（ケラジミカン）とは全く別種のカンキツである（山本ら、2006）のでケラジ（諸鈍）と表記した。

10月以降、小胚が退化するため（奥代ら、1981）、その前の2007年9月上旬から中旬にかけて各系統10果の自然受粉果を採取し、調査まで冷蔵庫で保存した。1果から2種子を無作為に選び、20種子の胚数を実体顕微鏡を用いて計測した。

胚数と雑種実生出現率との関係

‘興津早生’、桜島コミカン、‘十万温州’、カブス、ハナユ、シクワサー（興津）および‘吉田ボンカン’を種子親に、花粉親には‘麻豆紅柚’を用いて、2007年4月下旬から5月上旬に人工交雑した。種子親の開花直前の花弁および葯を全て取り除き、‘麻豆紅柚’の花粉を受粉し、直ちに袋かけした。同年12月上旬に果実を採取した。なお、シクワサーには多様性が存在し（Yamamoto ら、2017）、シクワサーだけでは系統が特定できないため、シクワサー（興津）として、農林水産省果樹試験場興津支場導入系統であることを明記した。

前述と同様の時期および方法で種子親系統の胚数を調査した。‘興津早生’のみは6種子の結果であった。

得られた種子は、外種皮および内種皮を剥皮後、水で湿らせたろ紙を敷いたシャーレ上に播種し、暗黒下、25℃で1週間培養した。1週間後、幼根が発根している胚を鹿沼土を用土として3号ポットに移植し、25℃、16時間日長で発育させた。本葉をアイソザイム分析の材料とした。

アイソザイム分析は山本ら（1999）に準拠して、Gotを検出した。本研究では*Got-1*のみを対象とし、その対立遺伝子名はHiraiら（1986）に従った。その結果に基づき雑種実生と珠心胚実生を識別した。

結果および考察

調査した13系統の胚数の結果をTable 1に示した。川畑ミカンとウスカワ（キシウミカン系統）が単胚性で、

他は多胚性であった。多胚性系統のうち、辺塚ダイダイは平均胚数が1.4個と最も少なく、キミカンが41.4個と最多であった。ISSR分析で区別のつかないカーブチー系統の喜界ミカンとナツクニン（山本ら、2010）の胚数はほぼ同じであった。また、SRAP分析で明確に識別できる徳之島のシクワサー2系統（Yamamoto ら、2017）は、胚数の面では大きな差異はなかった。

100種類以上のカンキツの胚数を報告した上野ら（1967）も川畑ミカンおよびキシウミカンを単胚と報告しており、本研究の結果と一致した。彼らは、胚数がそれぞれ1.42と1.38のウジュキツおよび広島夏ブントンを多胚性では最少の胚数と報告している。これは辺塚ダイダイの胚数とほぼ一致し、本系統が最少レベルの胚数の多胚性系統であることが確認できた。他の多胚性のクネンボやカーブチーについては、上野ら（1967）の方が胚数がやや少なかった。上野ら（1969）は胚数を11～1月に調査している。多胚性種子の小胚は10月以降退化することもあるため（奥代ら、1981）、両研究間で差異が認められた可能性もある。その場合、本研究の結果が本来の胚数を示したものと考えられる。

辺塚ダイダイ、コズ、シーカーおよびケラジ（諸鈍）は、本研究で初めて胚数が明らかとなった。また、同種であっても品種・系統によって胚数は異なることから（奥代ら、1981）、シクワサー類をはじめ現地収集系統の胚数の解明も意義が高い。得られた結果は在来カンキツの台木利用や育種における基礎情報として活用可能である。

次に胚数と雑種実生出現率との関係について検討した。種子親のうち、桜島コミカンは単胚性で、他の6系統は多胚性であった。多胚性系統の胚数は、ハナユで3.2個、カブスで8.2個、‘十万温州’およびシクワサー（興津）で約25個、‘吉田ボンカン’および‘興津早生’で約35個であった（Table 2）。

種子親系統の*Got-1* 遺伝子型は、カブスを除く6系統でSS、カブスでSAであった。一方、花粉親の‘麻豆紅柚’の遺伝子型はFFであった（Table 2）。このことから、いずれの組み合わせでも雑種実生はFSまたはFAとなり、種子親と同じ遺伝子型の珠心胚実生と確実に区別できることが確認できた。

各組み合わせにおける雑種実生出現率をTable 3に示した。出現した全実生に対する割合と播種した種子数に対する割合の両者を算出した。胚数が最多で播種数が少なかった‘興津早生’で雑種実生1個体が出現したため、種子に対する雑種実生出現率が高くなったが、それを除くと、いずれも胚数の増加につれて雑種実生の出現率は低くなった。胚数が約8個では約20%の雑種実生が確認できたが、胚数が約25個以上で雑種はほとんど出現しなくなった。

種子親の胚数と雑種実生獲得率の関係については、奥代ら（1981）が報告している。この研究ではほとんどの組み合わせでカラタチを花粉親として使用している。カラタチを花粉親とすると、その三出葉性が遺伝的に優性

Table 1. Number of embryos per seed in citrus distributed on Amami Islands or Kagoshima

Accession	Latin name	Distribution	Mean number of embryos ^z
Kawabatamikan	<i>Citrus aurea</i> hort. ex Tanaka	Kagoshima	1.0 ± 0.0
Hetsukadaidai	<i>C. sp.</i>	Kagoshima	1.4 ± 0.13
Kimikan	<i>C. sp.</i>	Kagoshima	41.4 ± 4.64
Kozu	<i>C. depressa</i> relative	Yakushima	16.3 ± 1.09
Kunenbo	<i>C. nobilis</i> Luor.	Amami-Kyushu	17.7 ± 2.01
Usukawa	<i>C. kinokuni</i> hort. ex Tanaka	Kikaijima	1.0 ± 0.0
Fusu	<i>C. rokugatsu</i> hort. ex Y. Tanaka	Kikaijima	8.8 ± 0.76
Shiikuu	<i>C. sp.</i>	Kikaijima	9.4 ± 0.75
Kikaimikan	<i>C. keraji</i> hort. ex Tanaka	Kikaijima	13.5 ± 1.06
Keraji (Shodon)	<i>C. sp.</i>	Kakeromajima	10.9 ± 1.50
Natsukunin	<i>C. keraji</i> hort. ex Tanaka	Tokunoshima	11.9 ± 1.27
Shiikunin (Kara)	<i>C. depressa</i> Hayata	Tokunoshima	15.0 ± 1.39
Shiikunin (Ama)	<i>C. depressa</i> Hayata	Tokunoshima	16.8 ± 0.96

^z Twenty seeds were investigated.Table 2. Number of embryos per seed and genotype of *Got-1* in parental citrus accessions

Accession	Latin name	No. of seeds investigated	Mean number of embryos	<i>Got-1</i> genotype
Seed parent				
Sakurajima Komikan	<i>Citrus kinokuni</i> hort. ex Tanaka	20	1.0 ± 0.0	SS
Hanayu	<i>C. hanaju</i> Siebold ex Shirai	20	3.2 ± 0.43	SS
Kabusu	<i>C. aurantium</i> L.	20	8.2 ± 1.08	SA
Juman Unshu	<i>C. unshiu</i> Marcow.	20	24.7 ± 2.47	SS
Shiikuwasha (Okitsu)	<i>C. depressa</i> Hayata	20	25.3 ± 1.12	SS
Yoshida Ponkan	<i>C. reticulata</i> Blanco	20	35.7 ± 2.51	SS
Okitsu Wase	<i>C. unshiu</i> Marcow.	6	37.7 ± 5.72	SS
Pollen parent				
Mato Anyu	<i>C. maxima</i> (Burm.) Merr.	— ^z	—	FF

^z Not determined.

Table 3. Hybrid seedlings emerging from polyembryonic seed in citrus

Seed parent ^z	No. of seeds	No. of seedlings appeared	No. of hybrid seedlings	Hybrids as percentage of	
				seeds	seedlings
Sakurajima Komikan	10	10	10	100.0	100.0
Hanayu	100	77	59	58.0	76.6
Kabusu	100	106	21	21.0	19.8
Juman Unshu	57	95	1	1.8	1.1
Shiikuwasha (Okitsu)	100	93	0	0.0	0.0
Yoshida Ponkan	15	16	0	0.0	0.0
Okitsu Wase	6	31	1	16.7	3.1

^z 'Mato Anyu' was used as a pollen parent in all cross combinations.

なので確実に雑種実生を識別できるが、この組み合わせではカンキツを花粉親とした場合よりも雑種実生の出現率が高くなる（西浦・岩崎，1964）。また、一部カンキツを花粉親とした組み合わせもあるが、葉の形態的特徴により雑種実生と珠心胚実生の識別を実施しており、幼若実生段階では間違いの可能性がある。本研究では花粉親にカンキツを用い、アイソザイム分析の結果に基づき雑種実生と珠心胚実生の識別を実施しており、その信頼性は極めて高い。

本研究の結果と奥代ら（1982）のカンキツを花粉親とした組み合わせの結果を比較すると、同程度の胚数の場合、奥代ら（1982）の方がやや雑種実生の出現率は高かったが、その差は大きいものでは無かった。両者の研究から、胚数と雑種実生の出現率との間には強い関係があること、胚数が25～30個以上になると、ほとんど雑種実生が出現しないことが確認できた。

現在、CAPS分析のように簡便で信頼性の高いDNA分析が開発されており（Shimadaら，2014）、交雑育種を実

施するにあたって、幼若実生段階での多胚性種子における雑種実生の識別は容易になったが、雑種実生が出現しない限り、識別技術も利用できない。そのため、多胚種子の胚数削減技術（中谷ら, 1978; Watanabe, 1985）や未熟種子の胚培養（Tan ら, 2007）等の雑種実生獲得率向上技術の開発は極めて重要な課題である。また、台木利用の面からは、胚数が約25個では実生のほとんどが珠心胚由来となるので、均一な台木作出にはそれ以上の胚数が望ましいと考えられた。

要 約

鹿児島在来カンキツ13系統の胚数を調査した。川畑ミカンとウスカワ（キシユウミカン系統）が単胚性で、他は多胚性であった。多胚性系統のうち、辺塚ダイダイは平均胚数が1.4個と最も少なく、キミカンが41.4個と最多であった。次に、胚数と雑種実生出現率との関係について調査した。種子親のうち、桜島コミカンは単胚性で、他の6系統は多胚性であった。種子親の胚数は、1個（単胚性）から約35個までの範囲にあった。花粉親は‘麻豆紅柚’とした。胚数の増加につれて雑種実生の出現率は低くなった。胚数が約8個では約20%の雑種実生が確認できたが、胚数が約25個以上で雑種はほとんど出現しなくなった。

引用文献

- Hirai, M., I. Kozaki and I. Kajiura. 1986. Isozyme analysis and phylogenetic relationship of citrus. Japan. J. Breed. 36: 377–389.
- 松本亮司. 2001. 晩生カンキツ ‘不知火’. 果樹試報. 35: 115–120.
- 中谷宗一・池田 勇・小林省蔵. 1978. 多胚性カンキツ品種の雑種獲得の効率化に関する研究. 果樹試報. E2: 25–38.
- 西浦昌男・岩崎藤助. 1964. カンキツの育種に関する研究. 第2報 獲得実生数と温州ミカンの雑種獲得率. 園試報. B3: 1–10.
- 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. D3: 9–22.
- Shimada, T., H. Fujii, T. Endo, T. Ueda, A. Sugiyama, M. Nakano, M. Kita, T. Yoshioka, T. Shimizu, H. Nesumi, Y. Ikoma, T. Moriguchi and M. Omura. 2014. Construction of a citrus framework genetic map anchored by 708 gene-based markers. Tree Genet. Genomes 10: 1001–1013.
- 園田真一郎・内田興徳・熊本 将・富永茂人・山本雅史・久保達也・日高 望. 2014. 15種類の台木がタンカンの生育、収量および果実品質に及ぼす影響. 園学研. 13別2: 329.
- Tan, M., J. Song and X. Deng. 2007. Production of two

mandarin × trifoliate orange hybrid population via embryo rescue with verification by SSR analysis. Euphytica 157: 155–160.

- 上野 勇・岩政正男・西浦昌男. 1967. カンキツ属および近縁属の胚数. 園試報. B7: 11–21.
- Watanabe, H. 1985. Artificial control of polyembryogenesis in *Fortunella* by continuous gamma irradiation. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 110: 418–421.
- 山本雅史・福田麻由子・古賀孝徳・久保達也・富永茂人. 2010. 喜界島（鹿児島県）の在来カンキツであるケラジミカン（*Citrus keraji*）の来歴の検討. 園学研. 9: 7–12.
- 山本雅史・松尾洋一・國賀 武・松本亮司・山田彬雄. 1998. シイクワシャー類のアイソザイム及びRAPD分析. 果樹試報. 30/31: 39–51.
- 山本雅史・松島健一・伊地智 告・上地義隆・川口昭二・中野八伯・野村哲也・谷村音樹・久保達也・富永茂人. 2006. 奄美諸島における在来カンキツ遺伝資源の調査とその保存. 鹿児島大学農場研報. 29: 5–11.
- Yamamoto, M., A. Takakura, A. Tanabe, S. Teramoto and M. Kita. 2017. Diversity of *Citrus depressa* Hayata (Shiikuwasha) revealed by DNA analysis. Genet. Res. Crop Evol. 64: 805–814.
- 山本雅史・寺本さゆり・喜多正幸・北島 宣・川口昭二・福留弘康・広瀬 潤・西澤 優・香西直子. 2021. 鹿児島県島嶼部および沖縄県の在来カンキツの調査とその保存. 鹿児島大学農場研報. 42: 7–15.