

ブントンの小粒種子利用による3倍体の作出と生育促進

誌名	山口県農業試験場研究報告 = Bulletin of the Yamaguchi Agricultural Experiment Station
ISSN	03889327
著者名	山榮, 午朗 金子, 和彦 松本, 理
発行元	山口県農業試験場
巻/号	47号
巻号補足	
掲載ページ	p. 26-31
発行年月	1996年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター

Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



ブンタンの小粒種子利用による3倍体の作出と生育促進

山榮午朗・金子和彦・松本 理

Production of Triploids from Small Seeds in *Citrus grandis* and Their Vigorous Growth

Goro YAMAE, Kazuhiko KANEKO and Osamu MATSUMOTO

Abstract. In order to obtain seedless *Citrus grandis*, the triploid seedlings were produced by small seed culture. Seven triploid seedlings were obtained from small seeds under 0.15g fresh weight. They grafted to *Poncirus trifoliata* seedling *in vitro* were grown more rapidly and vigorously.

緒 言

ブンタンは、我が国ではザボンともいわれ柑橘類の中でも巨大な果実を有する高級果実の一つである。しかもその品質は、外観は滑らかで美しく、果汁は少ないが食味は良く、肉離れしやすく食べやすい性質を持っている。このように優良な品質を有する反面、1果当たりの種子数が多い難点がある。柑橘類の育種において、無核性は重要な形質の一つである。この無核性品種育成方法の一つとして3倍体利用がある。柑橘類の3倍体は、2倍体と4倍体の組合わせや2倍体同士の組合わせによる交配で偶発的に出現し、3倍体の成熟時の種子の大きさは2倍体のものに比べ、小粒であることが報告されている¹⁾。

そこで、ブンタンの無核化を図る目的で、はじめに4倍体の作出及び2倍体と4倍体の交配による3倍体の育成を試みた。つぎに、2倍体同士の交配種子から3倍体を育成するため、3倍体の出現頻度と種子の大きさとの関係を検討した。さらに、選抜育成した3倍体の生育促進法について、試験管内接木法を検討した。その結果、2倍体ブンタン同士の組合わせと2倍体ブンタンの放任受粉から得られた小粒種子の中より3倍体を選抜育成することができたので報告する。

材料及び方法

萩柑きつ試験場で育成された「土佐ブンタン」と「水晶ブンタン」を1989年5月に交配し、その成熟果の種子を用いて4倍体ブンタンの育成を試みた。0.1%コルヒチンを含むMurashige & Skoog (MS) 液体培地

で5日間と7日間、それぞれ20粒の種子を回転培養した。処理後、MS液体培地で7日間継代しMS寒天培地に播種して幼植物体とし、根端の染色体数を調査した。

つぎに、萩柑きつ試験場で育成された「土佐ブンタン」と静岡柑きつ試験場より分譲を受けた4倍体「ナツダイダイ」を供試材料に2倍体と4倍体との組合わせによる3倍体の作出を試みた。「土佐ブンタン」に4倍体「ナツダイダイ」を花粉親として1989年5月に交配し、その成熟果の全ての種子を取り出し、MS寒天培地で培養した。その後、生育した幼植物体の根端の染色体数を調査した。

さらに、小粒種子利用により3倍体を育成するため、萩柑きつ試験場で育成された「土佐ブンタン」、「水晶ブンタン」、「市大谷」を供試材料に用いた。1989年に「水晶ブンタン」、「市大谷」の2品種を花粉親として「土佐ブンタン」と交配した。1990年以降は、1992年を除き、「土佐ブンタン」に「水晶ブンタン」を花粉親として交配を行った。1992年は「土佐ブンタン」の放任受粉より得られた成熟果を用いて3倍体の選抜を行った。1989年は、交配後、得られた成熟果の全種子のうち、生体重0.05g以下の小粒種子を選別した。1990年は、交配後90日の幼果の全種子と交配後220日の成熟果の全種子のうち生体重が0.10g以上0.15g未満のものと、0.10g未満のものを選別した。1991年は、全種子のうち生体重0.15g以上0.20g未満、0.10g以上0.15g未満、0.10g未満を選別した。1992年及び1993年は、生体重0.20g未満の小粒種子を選別した。

選別した小粒種子を70%エタノールで30秒間、有効塩

素0.5%の次亜塩素酸ナトリウムで20分間消毒した後、2回滅菌水で洗浄した。その後、種子をショ糖3%、寒天0.8%を含むMS寒天培地で無菌培養した。また、1993年以降はアデニン25mg/ℓ、麦芽抽出物400mg/ℓを加えたMurashige & Tucker (MT) のゲルライト固形培地で培養した。培養は、25℃、16時間日長、強光条件下で行った。

根端の染色体数調査は、培養途中の伸長している幼植物体の根端を取り出し、蒸留水中で4℃、24時間前処理した。固定は、酢酸-エタノール(1:3)の固定液で24時間行った。その後、固定した根端を60℃ 1N塩酸溶液中で2分間処理後、イオン交換水で2回洗浄し、1%プロピオン酸オルセイン液で染色した後に染色体を観察した。染色体数の調査は、1500倍の光学顕微鏡下で行い、染色体数18本の2倍体と染色体27本の3倍体を識別した。

得られた3倍体の培養器内での生育が遅いため、培養器内接木を行い、生育の促進を図った。1992年まで小粒種子培養によって得られた「土佐ブントン」×「水晶ブントン」の3倍体(1991年交配)3個体と1992年に放任受粉した「土佐ブントン」の3倍体2個体を1993年に培養器内で接木した。接木は、MT培地にアデニン25mg/ℓ、麦芽抽出物400mg/ℓを加えたゲルライト固形培地上に無菌播種した「カラタチ」実生台木の上部を切り取り、台座に5mm程の切り込みを入れ、3倍体個体の側芽をクサビ型に削り台木に挿入して割接ぎした。1994年には、「土佐ブントン」×「水晶ブントン」(1993年交配)の3倍体2個体について同様に行った。

さらに、1991年に交配、小粒種子培養によって得られた「土佐ブントン」×「水晶ブントン」の3倍体2個体を用いて平成6年度に順化、寄接ぎを行い生育の促進を図った。順化は、培養器から3倍体を取り出し、根部に付着した培地を水で洗浄後、鹿沼土の入ったポットへ移植した。移植後、25℃、遮光条件下で生育させた。寄接ぎは、本試験場内で育成した2~3年生実生の「ラフレモン」を台木に用いた。乾燥防止のため、接木部をパラフィルムで巻いた。寄接ぎ後は、25℃、遮光条件下で生育させた。

結 果

種子をコルヒチン添加培地で5日間と7日間それぞれ処理した結果、20粒の種子全てが2倍体であり4倍体ブントンは育成できなかった。

2倍体「土佐ブントン」と4倍体「ナツダイダイ」を

交配して生育した成熟果19果から、5粒の種子を得た。5個体の実生の染色体数を調査した結果、全て2倍体であり3倍体は作出できなかった。

小粒種子培養による3倍体の育成で、第1表に1989年に実施した各交配組合わせにおける小粒種子の染色体数の調査結果を示した。「土佐ブントン」と「水晶ブントン」の交配果57果より31粒、「土佐ブントン」と「市大谷」60果より39粒の計70粒の小粒種子が得られた。しかし、小粒種子由来の幼植物体は、全て染色体数18本の2倍体であった。

1990年に行った幼果と成熟果の種子形成数及び成熟果の生体重別の種子数と染色体数調査の結果を第2表に示した。8個の幼果から種子は5粒しか得られず、生育した5個体の染色体数調査の結果、全て2倍体であった。一方、成熟果からは14果で1054個の種子が得られた。0.10g以上0.15g未満の種子は68個、0.10g未満のものは44個であった。しかし、いずれの小粒種子とも生育個体の染色体数は全て2倍体であった。

第3表に、1991年に行った生体重別の小粒種子由来植物の染色体数を示した。生体重0.20g未満の小粒種子は全部で487粒得られ、そのうち、第1図に示した染色体数27本の3倍体が、種子の生体重0.10g未満で1個体、0.10g以上0.15g未満で2個体の計3個体が検出された。生体重0.15g以上0.20g未満の種子に3倍体は検出されなかった。

1992年に行った染色体数調査の結果を第4表に示した。成熟果より生体重0.20g未満の小粒種子213粒が得られた。そのうち、種子の生体重0.10g未満で1個体、0.10g以上0.15g未満で1個体の計2個体の3倍体が検出された。生体重0.15g以上0.20g未満では、3倍体は検出されなかった。

第5表に1993年に行った染色体数調査の結果を示した。生体重0.20g未満の小粒種子は198粒得られ、0.10g未満で1個体、0.10g以上0.15g未満で1個体の計2個体の3倍体が検出された。また、これまでと同様に生体重0.15g以上0.20g未満では、3倍体は検出されなかった。

全種子数に対する生体重0.15g未満種子の発生率と3倍体の出現頻度の結果を第6表に示した。生体重0.15g未満の小粒種子の発生率は、1990年で10.7%、1991年で5.9%、1992年で10.5%、1993年で10.6%となり、1991年を除き約10%の発生率であった。また、0.15g未満種子当たりの3倍体の出現頻度は2.2~2.5%であった。

培養器内での3倍体の生育が遅いため、3倍体を「カラタチ」実生に割接ぎした結果、第2図に示したとおり

第1表 各交配組合わせにおける小粒種子由来植物の染色体数調査結果(1989年)

交配組合わせ	成熟果数	小粒種子数 (生体重0.05 g 以下)	2 倍体個体数	3 倍体個体数
土佐ブantan×水晶ブantan	57	31	31	0
土佐ブantan×市大谷	60	39	39	0

第2表 幼果と成熟果(生体重別)小粒種子由来植物の染色体数調査結果(1990年)

種子の生体重 (土佐ブantan×水晶ブantan)	種子数	生育個体数	2 倍体個体数	3 倍体個体数
幼 果	5	5	5	0
0.10 g 未満	44 (4.2)	27	27	0
0.10 g 以上0.15 g 未満	68 (6.5)	48	48	0
0.15 g 以上	758 (71.9)	—	—	—
不稔種子	184 (17.4)	—	—	—

注：成熟果は果実数14果、幼果は8果から全種子を採取。 —は未調査。 ()内は全種子数に対する%。

第3表 生体重別小粒種子由来植物の染色体数調査結果(1991年)

種子の生体重 (土佐ブantan×水晶ブantan)	種子数	生育個体数	2 倍体個体数	3 倍体個体数
0.10 g 未満	29 (1.4)	26	25	1
0.10 g 以上0.15 g 未満	95 (4.5)	82	80	2
0.15 g 以上0.20 g 未満	363 (17.1)	344	344	0
0.20 g 以上	1,365 (64.4)	—	—	—
不稔種子	266 (12.6)	—	—	—

注：()内は全種子数に対する%。 —は未調査。

第4表 生体重別小粒種子由来植物の染色体数調査結果(1992年)

種子の生体重 (土佐ブantanの放任受粉)	種子数	生育個体数	2 倍体個体数	3 倍体個体数
0.10 g 未満	30 (3.5)	23	22	1
0.10 g 以上0.15 g 未満	61 (7.0)	55	54	1
0.15 g 以上0.20 g 未満	122 (14.0)	113	113	0
0.20 g 以上	371 (42.6)	—	—	—
不稔種子	286 (32.9)	—	—	—

注：()内は全種子数に対する%。 —は未調査。

第5表 生体重別小粒種子由来植物の染色体数調査結果(1993年)

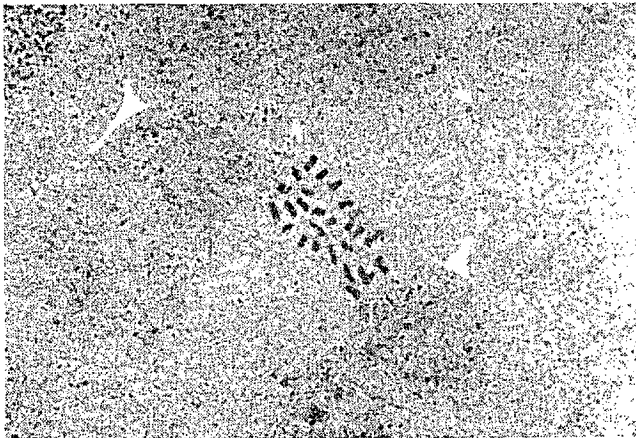
種子の生体重 (土佐ブantan×水晶ブantan)	種子数	生育個体数	2 倍体個体数	3 倍体個体数
0.10 g 未満	28 (3.7)	26	25	1
0.10 g 以上0.15 g 未満	53 (6.9)	50	49	1
0.15 g 以上0.20 g 未満	117 (15.3)	112	112	0
0.20 g 以上	338 (44.1)	—	—	—
不稔種子	231 (30.0)	—	—	—

注：()内は全種子数に対する%。 —は未調査。

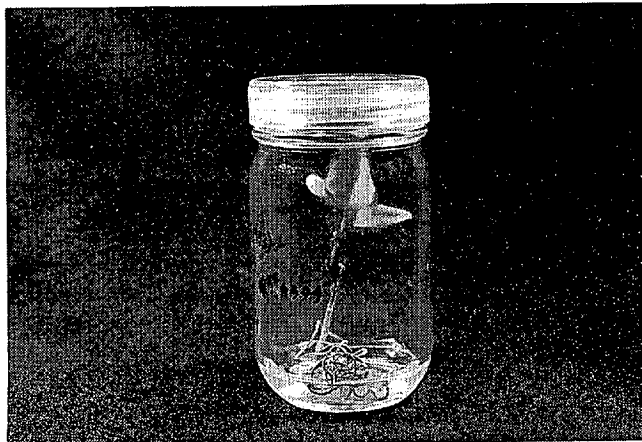
第6表 全種子数に対する生体重0.15 g 未満種子の発生率と3倍体個体の出現頻度

試験年度	全種子数	0.15 g 未満種子数	3倍体個体数	3倍体出現頻度(%) (0.15 g 未満種子当たり)
1990年	1,054*	112 (10.7)	0	0
1991年	2,118	124 (5.9)	3	2.4
1992年	870	91 (10.5)	2	2.2
1993年	767	81 (10.6)	2	2.5

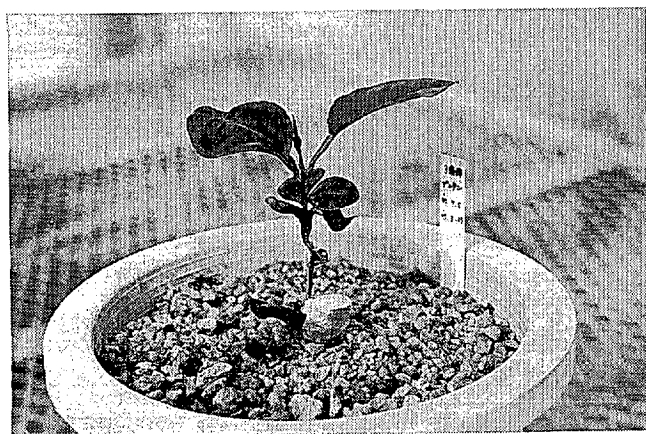
注：*成熟果から採取。 () 内は全種子数に対する%。



第1図 3倍体 ($2n=27$) 個体の染色体像



第2図 培養器内接木による3倍体個体の生育促進 (カラタチ実生へ割接ぎ)



第3図 寄接ぎによる3倍体個体の生育促進

生育が促進された。さらに、2個体の3倍体を順化した後、「ラフレモン」へ寄接ぎしたところ、第3図に示したとおり生育が促進された。

考 察

カンキツ類において、3倍体は果皮が薄く無核となるなど優良な果実品質が期待できるため、3倍体の育成は重要な育種目標となっている。

2倍体と4倍体の交配により3倍体個体を得るため、ブンタンの4倍体育成を試みた。多胚性カンキツ類では、同質4倍体が珠心胚実生中に偶発的に生じることが知られている¹⁰⁾が、単胚性のブンタンでは4倍体作出するためにはコルヒチン処理等を行い、染色体数を倍加させる必要がある。そこで、本試験では2倍体ブンタン同士の交配種子からコルヒチン処理によって交配用4倍体ブンタンの作出を試みたが、4倍体は得られなかった。

つぎに、単胚性の「土佐ブンタン」を母本として4倍体「ナツダイダイ」と交配し、3倍体の作出を試みた。交配後、得られた種子のほとんどが不完全種子で完全種子はわずか5粒しかなかった。2倍体と4倍体の組み合わせにおける種子形成について、生山ら⁶⁾は4倍体「川野ナツダイダイ」を花粉親にした場合、得られる完全種子の出現率が著しく低くなると報告している。5個体の実生の根端の染色体数を調査したところ、全て2倍体であった。生山ら⁶⁾は単胚性2倍体品種の「カワチバンカン」、「スイートスプリング」、「平戸ブンタン」他9品種を母本とし、これらに4倍体の「フナドコ」及び「川野ナツダイダイ」を交配した場合、倍数体の出現頻度の違いにより3つのタイプに大別した。第1のタイプは、後代に3倍体と4倍体、及び6倍体が出現する組合わせで「カワチバンカン」、「ヒュウガナツ」、「ハッサク」等が含まれた。第2のタイプは、花粉親の違いに関係なくほとんど4倍体しか出現しない組合わせで「スイートスプリング」が含まれた。第3のタイプは、花粉親の違いに関係なくほとんど3倍体しか出現しない組合わせで「清見」

及び「平戸ブantan」が含まれた。このうち、「平戸ブantan」と4倍体「ナツダイダイ」との組合わせでは、3倍体が87.5%の高頻度で得られたと報告された。しかし、本試験では3倍体は出現せず、この報告と異なる結果となった。したがって、2倍体「土佐ブantan」と4倍体「ナツダイダイ」の交配による3倍体の育成は困難であると判断した。

そこで、カンキツ類で知られている小粒種子の中に偶発的に出現する3倍体利用⁹⁾について検討した。小粒種子の中に3倍体が発生する理由として、Esenら¹⁾は、3倍体の胚と胚乳の倍数性比の違いによるものと考えた。すなわち、3倍性の胚には5倍性の胚乳が伴われており、胚と胚乳との間の倍数性比は正常な2:3ではなく3:5であることから3倍体種子の大きさが成熟時において通常の2倍体種子に比べ約1/6~1/3しかないことを報告している。3倍体の倍数性比の値が小さいことにより、種子の発達が早期に終結すると考えた。

そこで、本試験で供試するブantanの組合わせでの3倍体の出現頻度と種子の大きさとの関係について検討を行った。3倍体種子は2倍体種子に比べ胚の発育が早く完了し、早い時期から発芽可能になることが確かめられている¹¹⁾。したがって、本試験では成熟果と幼果の双方の小粒種子を取り出し培養を行ったが、いずれの果実種子からも3倍体は出現しなかった。つぎに、生体重0.20g未満の種子に限定して倍数性の調査を行った。その結果、異数体が発生することもなく、「土佐ブantan」×「水晶ブantan」で5個体、「土佐ブantan」の放任受粉で2個体の計7個体の3倍体を育成することができた。岩政¹⁴⁾は、「本田ブantan」を用い平均生体重0.36gの大、0.23gの中、0.11gの小の3階級に区分して倍数体の出現頻度を調査している。その結果、小に区分した種子は大の1/3の生体重であったが、全て2倍体で、中に区分した種子の約10%に3倍体が認められたと報告している。本試験で得られた3倍体は全て生体重0.15g未満の小粒種子から得られており、「本田ブantan」の場合と結果が異なった。

つぎに、小粒種子（普通種子の生体重の1/6~1/3）の1果当たりの発生率と3倍体の出現頻度について、喜多ら¹⁵⁾が「イヨカン」、「マーコット」、「アンコール」を用いて調査を行っている。それによると、「イヨカン」や「マーコット」では全種子数に対する小粒種子の発生率はそれぞれ2.5%、2.2%と高く、「アンコール」では0.6%と低い値を示している。また、小粒種子当たりの3倍体の出現頻度については、「イヨカン」で25%、「アンコー

ル」で0.83%であったと報告されている。本試験の「土佐ブantan」と「水晶ブantan」の組合わせでは、全種子数に対する生体重0.15g未満の小粒種子の発生率が、1991年の5.9%を除き約10%と高い値を示した。また、小粒種子当たりの3倍体の平均出現頻度は、2.4%であった。このことは、「土佐ブantan」と「水晶ブantan」の組合わせでは、「イヨカン」や「マーコット」に比べ小粒種子の発生率が高いが、小粒種子当たりの3倍体の出現頻度はイヨカンの約1/10しかないことを示唆している。したがって、本試験によって3倍体の出現しやすい種子の大きさの範囲は限定することができたが、小粒種子の高い発生率のわりに3倍体の出現頻度が低いため、さらに効率的な3倍体の選抜手法が必要であると考えらる。

3倍体個体は、2倍体より幼植物体の生育が遅いが、発芽後1年経過すると2倍体を上回るほど生育旺盛になると報告されている¹⁰⁾。したがって3倍体を育成するため、緩慢な初期生育を促進させる方法の検討が必要である。本試験では、試験管内接木による生育促進法を検討した。培養器内での割接ぎは戸外と違って穂木と台木の接着面が乾燥することがないこと、外部の環境条件によって生育の弱い3倍体植物が淘汰されることがないなどの利点が考えられる。本試験では、培養器内割接ぎ法を用いることで穂木の生育が促進され順化までの時間を大幅に短縮できることが明らかとなった。

ブantanの無核化を図るため3倍体の育成をこれまで行ってきたが、ブantanの3倍体に関する知見が少ないため、今後できるだけ多くの3倍体を育成し、その育成個体の生育特性等を調査する必要がある。

摘 要

ブantanの無核化を図る目的で、3倍体の育成を試み、以下の結果を得た。

- 1 2倍体「土佐ブantan」の種子を0.1%のホルヒチン液で処理し、4倍体の作出を試みたが、4倍体は得られなかった。
- 2 2倍体「土佐ブantan」と4倍体「ナツダイダイ」との組合わせで3倍体の作出を試みたが、3倍体は得られなかった。
- 3 1991年交配の「土佐ブantan」×「水晶ブantan」の小粒種子を培養し、3個体の3倍体(2n=27)を育成した。
- 4 1992年に放任受粉させた「土佐ブantan」の小粒種子を培養し、2個体の3倍体を育成した。
- 5 1993年交配の「土佐ブantan」×「水晶ブantan」

の小粒種子を培養し、2個体の3倍体を育成した。

- 6 得られた3倍体は全て、生体重0.15 g未満の種子から得られており、3倍体が出現しやすい種子の大きさの範囲を限定することができた。
- 7 「土佐ブンタン」×「水晶ブンタン」(1991年交配)及び1992年に放任受粉した「土佐ブンタン」の3倍体のそれぞれ3個体と2個体を培養器内接木した結果、生育が促進された。

引用文献

- 1) Esen, A. and Soost, R. K. : Unexpected triploids in citrus : their origin, identification and possible use. J. Hered. 62, 329~333, 1971.
- 2) Esen, A. and Soost, R. K. : Precocious development and germination of spontaneous triploid seeds in citrus. J. Hered. 64, 147~154, 1973.
- 3) 堀内昭作 : カンキツ類の育種における胚培養ならびに組織培養の利用 育種学最近の進歩 19, 71~81, 1977.
- 4) 生山 巖・奥代直巳・高原利雄・石内伝治 : カンキツ類の倍数性育種に関する研究 I 珠心はい実生における主として葉の形態的特性による4倍体選抜について 果樹試報D 2, 29~38, 1980.
- 5) 生山 巖 : 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, 1981.
- 6) 生山 巖・奥代直巳・高原利雄 : カンキツ類の倍数性育種に関する研究 II 2X×4Xの組合わ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, 1982.
- 7) 生山 巖・奥代直巳 : 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×2Xの組合わせにおける3倍体の出現について 果樹試報D 5, 1~8, 1983.
- 8) 生山 巖 : カンキツ類の倍数性育種に関する研究 果樹試報 特報(3), 1~68, 1992.
- 9) 岩政正男 : これからの柑橘育種とその技術 農及園 49(2), 291~294, 1974.
- 10) 岩政正男 : 柑橘の品種, 静柑連, 254, 1976.
- 11) 岩政正男 : カンキツ無核品種の育成 育種学最近の進歩 19, 98~105, 1977.
- 12) 岩政正男 : 柑橘の育種に関する諸問題〔18〕 農及園53(1), 70~74, 1978.
- 13) 岩政正男 : 柑橘の育種に関する諸問題〔19〕 農及園53(2), 345~348, 1978.
- 14) 岩政正男 : 柑橘の育種に関する諸問題〔20〕 農及園53(3), 459~464, 1978.
- 15) 喜多景治・佐川正典・窪田聖一・松本英紀 : 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, 1987.
- 16) 小崎 格・野間 豊 : 果樹苗生産とバイオテクノロジー, 博友社, 232, 1990.
- 17) Pichit Toolapong, Haruki Komatsu and Masao Iwamasa : Triploids from Small Seeds of Polyembryonic Citrus Cultivars. Proc. Sch. Agric. Kyushu Tokai Univ. 14, 1~8, 1995.