

第 1 章 香酸柑橘類育種のこれまでと現状

1. 香酸カンキツとは

我が国でのカンキツ属の分類は田中長三郎氏によれば、花序の有無により、初生カンキツ亜属と後生カンキツ亜属に分け、さらに前者を 5 区、後者を 3 区に分けており、後生カンキツ亜属のユズ区はさらに原始ユズ亜属、真生ユズ亜属、擬ミカン亜区の 3 区に分けられる。利用上、真生ユズ亜区に属するカンキツ類は酸味が強く香りがよいことから、レモン類、ライム類、ダイダイ類（サワーオレンジ類）とともに香酸カンキツあるいは酢ミカンと呼ばれている。特に、酸味が強いだけでなく、香りが豊かで各地方の食文化として定着している酢ミカンが香酸カンキツと呼ばれているようである。真生ユズ亜区にはユズ、ハナユ、モチユ、スタチ、キズ、ユコウ、直七（田熊スタチ）、変化ミカン、イーチャンレモン、カボス等が属している。

世界的にみれば、500 万 t 以上の生産量があるレモン類が圧倒的に多く、次いでメキシコだけで 100 万 t 以上の生産量があるライム類、ヨーロッパで広くマーマレードの原料として栽培されているサワーオレンジ類が世界の三大香酸柑橘類であるといえるだろう。一方、国内ではこれらの香酸柑橘類はほとんど栽培されておらず、ダイダイ（臭橙、回青橙）が家庭用として散在している他は、レモンおよびライムとも瀬戸内海の一部地域で栽培されているに過ぎない。国内では真生ユズ亜区に属するカンキツ類の生産が多い。なかでも生産量約 17000 t のユズ、約 7,000 t のスタチ、約 6,000 t カボスが飛び抜けて多く、国内の三大香酸カンキツと呼ぶことができるだろう。

これら国内の三大香酸カンキツのうち、徳島県ではスタチの生産が全国 1 位（シェア 98%）、ユズの生産が全国 2 位（シェア 19%）で、国内で最も香酸カンキツの栽培が盛んである。徳島県では主に北部や東部でスタチ、南部および西部でユズの栽培が盛んで、スタチおよびユズの栽培面積は県内の果樹栽培面積のそれぞれ 24.8%および 15.1%を占める重要基幹品目である。そのため、徳島県では古くからスタチやユズの優良系統の選抜が行われてきた。

2. スタチの来歴と系統

スタチは古くから徳島県下で庭先果樹として植えられ、利用されてきた。田中諭一郎氏によればスタチの最も古い文献として宝永6年（1709）貝原篤信の著「大和本草」に初めて「リマン」という名称でスタチが説明されており、さらに永井精古の「阿波国見聞記」（1853）、小野蘭山著「大和本草批正」（1780）にはリマン、筑前にてはキズ、阿州にてスタチというとし、スタチとキズを同一と考えて記述されている。山中信古著「増訂南海包譜・下巻」（1865）にもスタチの記事がある。これらは古くからスタチが徳島県で栽培されていたことの証明であるが、スタチの正確な起源、来歴については明らかでない。

スタチは以前よりユズの近縁雑種または偶発実生であると推察されてきた。しかし、

Yamamoto ら（1993）によるミトコンドリア DNA と葉緑体 DNA の RFLP 解析では、スダチとユズのバンドパターンは異なり、スダチはブンタン類と全く同じバンドパターンを示した。このことは、スダチはユズの偶発実生ではなく、種子親にブンタン類が関与していることを示している。しかしながら、今までのアイソザイム分析や精油成分の分析、また形態的な観察からもスダチがユズの近縁であることは明らかであり、また果実や樹体の形態的な観察からスダチとブンタン類とが近縁であるとは考えられない。さらに、核リボゾーム DNA の RFLP 解析でもスダチとユズは比較的近縁であることが示されたが、スダチとブンタンが近縁であると考えすることはできなかった。以上のことから、スダチはブンタンから派生した何らかのカンキツとユズもしくはその近縁種との自然交雑によって生まれたカンキツであることが推察される。

また、スダチは特有のさわやかな香気が特徴的であるが、その複雑な香りのメカニズムや経時的な変化も近年になり明らかにされつつある（Padrayuttawat ら，1997；Tamura ら，1999；Mookdasanit ら，2003）。

スダチ栽培は歴史が古いため実生によって増殖されたり、偶発実生や枝変わりによって種々の系統が見られるが、トゲの有無、種子の有無から大きく4つの系統群に分けられる。無刺有核系統は一般的にメンスダチと呼ばれ、主要栽培系統は全てこの系統群である。後述する徳島1号や本田系の他にも神山4号、林、酒井、片岡、谷本、藤木系など各町村で選抜された系統がある。無刺無核系統はトゲおよび種子がほとんどないが、果実は小さい。後述の新居系の他にも佐藤系があり、特に系統名がついていない種なしスダチもほとんどがこの系統群に属する。有刺有核系はオンスダチと呼ばれ、在来の古木はほとんどこの系統群になる。樹勢が強く豊産性で果実は大きい果皮が厚く果面が粗い。神山1～3号、大東、速水系などがあるが、トゲが大きいのであまり栽培されていない。有刺無核系は有刺有核系と同様に樹勢が強く、長く太いトゲが多く発生する。種子は少ないが果実は小さい。盛岡系があるがトゲが大きいために普及性はなく栽培されていない。ただし、これらの系統は各産地や地方でそれぞれが同じような目的で個々に選抜されたものであり、別の系統が全く同じである可能性もある。

1) 徳島1号

1954年頃に徳島市渋野町で選抜されたもので1975年に命名され、県の奨励系統となっている。トゲは極めて短く、トゲのない枝梢も多い。果実は重さ25～35gで2L級果実（横径36mm以上40mm未満）中心に揃う。密着果率も低く葉裏果（接触面が黄色になった果実）も少ない。果皮は緑色で光沢があり美しく、果面はやや滑らかで果皮の薄さは中庸、種子は5個程度である（第1図）。果汁は早くから多く、香気は高い。着色開始期は9月中旬でやや早く、早生的な性質を持っているが、貯蔵性も高い。



第 1 図 徳島 1 号スダチの果実



第 2 図 本田系スダチの果実

2) 本田系

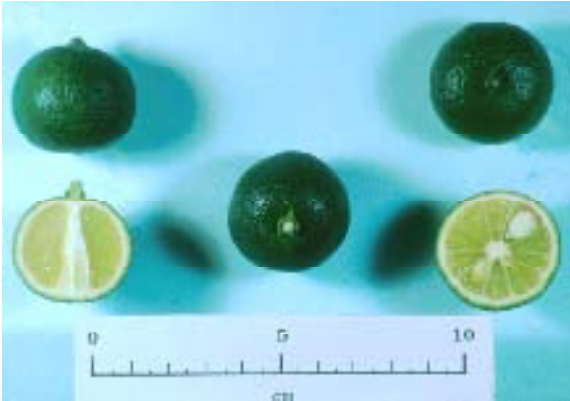
1972 年に徳島市農林水産課により，徳島市渋野町・本田清次氏園より選抜された系統である．徳島 1 号と並び，県下で最も多く栽培されている系統の一つである．果汁の充実が早く，早生的な性質があるため，ハウススダチはほぼこの系統である．1 果平均重 27g 程度で，果面はやや滑らかで，2L 級以上の果実に揃うが，果皮は薄く緑色度がやや淡い（第 2 図）．トゲは小さくて少ないが，徳島 1 号と比べてやや大きくて多い傾向がある．種子は 1 果に 5～6 個程度で果汁は多く，酸味が強い．全体的に徳島 1 号と類似している．

3) 新居系

徳島市八多町，新居伝太郎氏の園内で選抜された枝変わり系統．種なしスダチと呼ばれる無刺無核系の代表的な系統で，トゲは徳島 1 号より小さく全くトゲのない枝梢も多い．樹勢は弱く，収量はそれほど多くない．果面は滑らかで果皮は非常に薄い．M 級（横径 30mm 以上 33mm 未満）以上の果実には種子は 1～2 個含まれるが，S 級（横径 30mm 未満）以下の小さな果実はほとんど無核である（第 3 図）．有核系に比べてかなり小さいため市場での評価が低く，収量も少ないために経済栽培はほとんどされていないが，一部の農家で個人販売用や個人消費用として栽培されている．

4) 緑香系

1974 年に佐那河内村の酒井清氏園で発見された系統．葉色および果皮色とも非常に濃い緑色であるが，果肉色は淡い（第 4 図）．果実の大きさは 20～30g 程度で種子は多い．酸味はやや低く，果皮および果汁の香気はやや少ない．収穫期は遅く 9 月中～下旬に適期となる．果実品質はあまり良くないが，果皮色が濃く退色しにくいのために，貯蔵用として一部の地域で栽培されている．



第3図 新居系スダチの果実



第4図 緑香系スダチの果実

5) 芝原サワー

1983年に徳島市八多町の芝原孝昌氏園で発見された、本田系スダチの芽条変異四倍体である。四倍体の形質が強くでており、樹勢は強く、葉は丸みがあり厚い。枝梢は太く節間は短く、トゲも太い。花も他のスダチより大きく、花弁もやや厚く、子房、柱頭とも大きく花粉は多い。果実の大きさは40～80gで平均果重は60gと果実も大きく、一見して他のスダチと区別できる。果面は粗で果皮は厚く、果汁歩合はやや少ない傾向である。種



第5図 芝原サワーの果実

子は5～6個程度である(第5図)。スダチの香りを有し、中程度の香りを持っている。1997年に同氏によりスダチとして初めて品種登録された。本田系スダチの同質四倍体であり、本研究の倍数性育種において用いられている四倍体スダチも本田系スダチの同質四倍体であるので、基本的に同形質と考えていい。

3. ユズの来歴と系統

ユズは田中長三郎氏によれば、中国の揚子江上流の四川、湖北、雲南、甘肅各省からチベットにかけて野生しているという。またスィングル氏はギョウキツ (*Citrus ichangensis*) とミカン類との自然交雑によってできたものと推定している。

日本へは中国から朝鮮半島を経て渡来したと推定されているが、いつごろ渡来したのかは定かでない。和田茂樹著「日本柑橘の史的 연구」によれば、奈良時代797年につくられた「続日本紀」の宝亀3年(717)の条に奈良の都に降った隕石の大きさをユズにたとえてある。その後日本の薬物書「本草和名」(918)、「倭名類聚鈔」(934)にタチバナ、ユウジ、ダイダイ、カラタチと共にユズが記載されている。この後も平安時代や鎌倉時代の書

物にも度々ユズは登場している。このようにユズは古く奈良時代から日本で栽培され、平安時代には広く各地で栽培され、薬用あるいは果汁を食酢として利用されて現在に至っている。

ユズは歴史が非常に古いために全国に多くの系統があるが、全国的に普及した系統はなく、現在栽培されている系統も栽培地域に特有の系統が多い。それらは、もともとその地域に自生していた実生樹を選抜したものであり、その地域でつくりやすい系統が選ばれてきたといえる。そのほとんどは珠心胚実生であると思われ、スダチと同じく別系統として扱われていても、実際には全く同じ形質であるともあり得る。

1) 山根系

徳島県阿南市の山根護氏園から選抜された系統で、樹勢は強くトゲはユズ系統の中では小さく少なく少ない。本格的な結実期になると春枝のトゲはかなり少なくなる。結果期に入るのが早く、カラタチ台の苗木では3年生で結実し始め、5年生からはほぼ本格的な結果期となる。果実は100～140gで120g程度に揃う(第6図)。豊産性であるが、早くから結果するため樹冠の広がりには他の系統より小さい。徳島県奨励系統の1つ。



第6図 山根系ユズの果実

2) 海野系

徳島県那賀郡上那賀町の海野荒一氏園から選抜された系統。樹勢は強く、トゲは小さいが数が多い。隔年結果は比較的少なく豊産性である。山根系に比べてやや果実が小さいが、外観は美しい(第7図)。近年は小玉のユズが重宝される傾向にあり、本系統が見直されつつある。



第7図 海野系ユズの果実



第8図 多田錦の果実

3) 多田錦

徳島県名西郡神山町の多田謙一氏が山口県の友人からもらった無核ユズのなかから、トゲの少ない個体を選抜したものである。果実重は平均 80g 程度で、まれに種子が含まれることもあるが、ほとんどの果実が無核である。果皮はやや薄く、果形はやや扁平である(第 8 図)。トゲは小さく少ない。果実が小さいので商品価値が低く、経済栽培はされていない。1977年に同氏により品種登録された。

4) 平の香

徳島県那賀郡木頭村の平守行氏園において、ユズに由来する偶発実生として選抜されたが、おそらく珠心胚実生であると思われる。果実はやや扁球型で 140g 程度である(第 9 図)。当初、こはん症の発生が少ないということで選抜され、1993年に同氏により品種登録された。



第 9 図 平の香の果実

4. これまでの品種育成

上記のように、今までの香酸柑橘類の育種は、枝変わりや偶発実生を選抜する受動的な育種でのみ行われてきた。これはスダチやユズのみならずカボスでも同様であり、さらに世界三大香酸カンキツのレモン、ライムおよびダイダイ類においても積極的な育種はほとんど行われていない。これらの理由として、香酸柑橘類が全て多胚性であるため、胚培養をおこなわなければ交雑胚を得ることができなかつたこと、しかも、同種間の交配では交雑実生を識別することさえ困難であったこと、レモン・ライム類は栽培面積が膨大であるので、変異系統の選抜のみで優良な栽培系統を得ることができた可能性があること、国内で香酸カンキツの商業栽培が成り立ち始めたのはごく近年であること、などが考えられる。事実、1960年代当初は 500t 未満であった徳島県内のスダチ生産量は 1980年代前半には 5,000t を超え、現在では 7,000t 前後で安定している。これは、温州ミカンの寒波による大打撃や生産過剰対策による園地転換促進対策によるものもあるが、ユズやカボスの生産量も増えてきていることから、これらの果実が持つ酸味や風味が古くからの産地の消費者だけでなく、他地域の人々にも次第に浸透し、現代社会の食生活の中に取り入れられつつあることを示している。また、近年の農産物の低価格化、後継者不足等からほとんどの果樹の栽培面積が減少しているのなかで、スダチやユズの栽培面積は比較的安定しており、我が国の果樹産業において、香酸柑橘類は今後益々重要度が増してくると思われる。

このような社会情勢を背景に，徳島県でも 1982 年よりスダチ育種の研究が開始された．消費者は新居系のような無核系統を望み，生産者は徳島 1 号や本田系のような生産性を求めていたため，無核の大玉果を作る目的で無核スダチの果実肥大促進と有核スダチの無核化に関する研究が行われた．生育調節物質処理により果実肥大は促進され，無核化も可能であったが，果実はいずれも果皮が厚くなりすぎ，果汁量が少なくなった．また有核系を無核にすると果実は小さくなるなど生産性，商品性に問題があることが明らかになった．

徳島県果樹試験場（現：徳島県立農林水産総合技術センター果樹研究所）では 1990 年より本格的にバイテク研究がスタートし，倍数性育種，細胞融合，人為突然変異育種，自然変異個体の選抜の 4 方面から主にスダチを中心とした香酸柑橘類の育種にアプローチしてきた．

人為突然変異の誘発では，スダチおよびユズの主要形質を変えることなく無核化，無刺化することを目指し，それらの種子にアジ化ナトリウム処理やガンマ線の照射を行っている．今までに目標とするような変異は得られていないが，現在も継続調査中である．

また，自然突然変異個体の選抜では，各普及センターや農協と協力し 1990 ～ 1994 年にかけて徳島県下全域のスダチ農家を対象に無核や果皮色の濃い異個体の調査を行い，最終的に晩生系と無核系をそれぞれ選抜した．

1) 上板 6 号

1991 年に徳島市上八万町の奥田清一氏園より選抜した晩生系統．樹勢は徳島 1 号よりもやや強く，小さなトゲが発生する．果皮色は徳島 1 号よりも濃い，緑香系より薄い．種子はやや多いが緑香系より少なく，果肉色は徳島 1 号と同等である．収穫適期が 9 月中下旬とやや遅く，着色開始期も遅い（第 10 図）．また，予備試験では本田系よりも貯蔵性が優れていることが確認されており，高品質な貯蔵用系統として期待されており，現在も調査中である．



第 10 図

上板 6 号と徳島 1 号との着色開始期の違い

1998 年 10 月 5 日収穫

（左から：上板 6 号，徳島 1 号）

2) 上板7号

上板6号と同じく1991年に奥田清一氏園より選抜された。新居系などの一般的な無核系統よりもやや果実が大きく、新居系はM級果実以下が中心であるのに対して、上板7号はL級果実生産（横径33mm以上36mm未満）が中心となり、2L級果実でも種子数は少ない（第11図）。果皮が薄く果汁歩合は非常に高い。新居系より果実は大きいですが、徳島1号や本田系と比べると果実は小さく、収量も少ないため経済栽培品種としての普及は難しい。ただ、トゲもほとんどなく作りやすいので、家庭用や自家消費用として普及する可能性はある。



第11図 上板7号の2L級果実

第2章 倍数性による無核品種の育成

緒言

徳島県の香酸カンキツの中でも最も重要な作目であるスダチは、果実が小さい割に種子が多く、料理に直接果汁を絞るという利用形態のため、消費者からは種子を取り除く煩わしさが指摘されている。また、スダチ生産量の約半数は加工用であるが、その加工業者からは搾汁率の悪さや残渣の多さが指摘されており、絞るかすの廃棄については社会問題となった事もある。

スダチには在来の無核系統が存在し、個人販売として一部の農家が栽培しているものの、それらは果実が小さいために市場での単価が安く、また樹勢が弱いために生産量も少いため産地化はされてない。そのため、無核で2L級果実の安定生産ができる新しい無核スダチの作出が望まれていた。また、スダチの種子をなくすことは、消費拡大および加工時の残渣の軽減に寄与することが期待される。さらに、スダチのみならずユズやカボスなどほとんどの香酸カンキツの種子はスダチよりも多く、上記のような理由からも、これからの香酸カンキツ品種は無核であることが望ましい。

カンキツの無核化には、ウンシュウミカンなどの雄性不稔遺伝子を交雑育種により利用する方法（西浦ら，1983；奥代ら，1991）や、人為的に無核性の突然変異を誘発する方法（Hensz, 1971; Hearne, 1984）などがあるが、三倍体を利用するのも有効な手段だと考えられる。三倍体を利用する方法は古くから研究されており、二倍体同士の交雑により得られる小粒種子から作出する方法（Lapin, 1937; Esen・Soost, 1971）、二倍体と四倍体との交雑により得られる完全種子（Longly, 1926; Frost, 1948）または不完全種子（Starrantino・Recupero, 1981; Oiyama ら，1991）から作出する方法が報告されている。これらの方法で、アメリカでは‘Oroblanco’（Soost・Cameron, 1980）および‘Melogold’（Soost・Cameron, 1985）が育成されており、我が国でも農林水産省果樹試験場（現：独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構果樹研究所）において三倍体キンカン‘ぷちまる’が育成された（吉田ら，2000）。これらは全て種子親が単胚性品種であったため、三倍体の交雑実生が得やすかったが、多胚性の温州ミカンを種子親に用いた場合でも三倍体を得ており（金好ら，1997）、半数体と二倍体とを細胞融合することにより三倍体を作成することにも成功している（Kobayashiら，1997）。

徳島県果樹研究所では1990年から三倍体のスダチおよび新しい香酸カンキツの育成に取り組んできた。その結果、三倍体無核スダチ‘徳島3X1号’を育成し、2004年6月4日に品種登録された。そこで本報では、国内では‘ぷちまる’に続く2例目、多胚性カンキツとしては初めてとなる実用的な三倍体品種である‘徳島3X1号’の育成経過および特性を紹介すると共に、香酸カンキツの育種における倍数性利用の有効性について報告する。

材料および方法

材料として、徳島県果樹研究所県北分場内のスダチ (*Citrus sudachi hort. ex Shirai*), ユズ (*C. junos Sieb. ex Tanaka*) およびレモン (*C. limon Burm. f.*) を用いた。

1991年から1994年にかけて本田系スダチの芽条変異四倍体(1990年選抜, 系統名: HS4)と二倍体スダチの本田系, 徳島1号, 新居系および緑香系とのスダチ同士の正逆交配, または HS4 とユズの山根系および海野系, ユーレカレモンおよびベルナレモンとの正逆交配を行った。交配は各組合せとも露地栽培下で開花直前のつぼみの花弁および葯を切除し, 自然開葯した花粉を受粉した。また, 受粉後に紙袋をかぶせて他の花粉の混入を防いだ。

受粉後約90日に果実を収穫し, 結実数と種子数を調査した。完全種子および培養可能な不完全種子の合計を獲得種子数とした。種子は70%エタノールで殺菌し, 滅菌水で3回洗った後, 種皮を顕微鏡下で剥皮し, 5%ショ糖, 0.2%ゲルライトを含む Murashige and Tucker (MT)培地に胚分離して置床し, 25℃, 16時間日長, 3000lxの人工気象器内で培養した。

得られた植物体は, 暗黒下で発芽させて2週間育成したカラタチに割接した。一部の個体の根端を採取し, 生山(1981)の方法に従って染色体数を調査した。選抜した三倍体および未検定の個体は順化室で地上部が20cm程度になるまで育成した後, ガラス室内に移しポット栽培した。1995年に樹高が1m程度もしくはそれ以上に生育した個体のみを圃場に定植し, 1997年にMilandaら(1997)の方法に従ってフローサイトメーターで倍数性を識別および再調査した(竹中ら, 1997)。その年に識別できなかった個体については1999年に倍数性を再確認し, 三倍体と識別できた個体を一次選抜系統とした。また, 1997年および1998年に13年生本田系スダチに高接し, 開花促進を行った。結実した系統は7月上旬から10月下旬に収穫し, 主な果実形質(果実重, 横径, 縦径, 果皮色, 果肉色, 果皮厚, 果汁歩合, 種子数, 糖度, 酸度, 香り)と樹体形質(樹勢, 刺)について調査した。四倍体スダチと二倍体スダチとの交配で得られた三倍体は本田系スダチおよび新居系スダチと, 四倍体スダチと二倍体ユズとの交配で得られた三倍体については山根系ユズおよび多田錦との比較を行い, 将来有望と思える形質を示す系統を二次選抜系統とした。

結果

1. 三倍体の作出

二倍体を種子親とした場合はほとんどが不完全種子となり, 不完全種子から取り出した胚は根および茎葉が正常に発育しないものが多かった。1992年から1994年の四倍体スダチと二倍体スダチ系統との交配では, 二倍体を種子親に用いた場合の三倍体獲得率は平均で0.9%であり, 本田系, 徳島1号および緑香系を種子親に用いた場合に, 1個体もしくは3個体の三倍体を得られた。四倍体を種子親に用いた場合は完全種子を形成し, それから分離した胚もほとんどが正常に発育した。四倍体を種子親に用いた場合の三倍体獲得率は平

均 5.4%であった。また、緑香系を花粉親に用いた場合の三倍体獲得率が 6.3%で最も高く、新居系を花粉親に用いた場合の三倍体獲得率は 2.9%で最も低かった（第 1 表）。

また、四倍体スタチとユズおよびレモンとの交配においてもスタチと同様の結果になり、四倍体を種子親にした場合の方が多くの三倍体を得ることができ、三倍体獲得率もスタチとほぼ同様であった。ただし、レモンを種子親に用いた場合にのみ三倍体を得られなかった（第 2 表）。

第 1 表 1992 ～ 1994 年度における三倍体スタチの獲得率

交配組み合わせ ♀	交配 ♂	花数 (個)	結実数 (個)	獲得 種子数 (個)	三倍 体数 ^z (個)	三倍体 獲得率 ^y (%)
HS4	本田系	149	81	519	25	4.8
	徳島 1 号	127	45	246	13	5.3
	新居系	81	21	104	3	2.9
	緑香系	64	28	206	13	6.3
	速水系	44	13	90	4	4.4
合計		421	175	1075	58	5.4
本田系	HS4	76	42	109	1	0.9
徳島 1 号		104	34	199	3	1.5
新居系		88	29	40	0	0.0
緑香系		61	17	128	1	0.8
速水系		18	5	88	0	0.0
合計		347	127	564	5	0.9

z: 三倍体数はフローサイトメーターでの識別による

y: 三倍体獲得率は $100 \times \text{三倍体個体} / \text{獲得種子数}$

第 2 表 1992 ～ 1994 年度における HS4 とユズおよびレモンとの交配による三倍体カンキツの獲得率

交配組み合わせ ♀	交配 ♂	花数 (個)	結実数 (個)	獲得 種子数 (個)	三倍 体数 ^z (個)	三倍体 獲得率 ^y (%)
HS4	山根系ユズ	87	26	192	13	6.8
	海野系ユズ	42	11	72	4	5.6
	ユーレカレモン	45	3	15	1	6.7
	ベルナレモン	38	2	8	0	0.0
山根系ユズ	HS4	69	10	287	3	1.0
海野系ユズ		34	9	271	1	0.4
ユーレカレモン		168	15	132	0	0.0
ベルナレモン		30	1	8	0	0.0

z: 三倍体数はフローサイトメーターでの識別による

y: 三倍体獲得率は $100 \times \text{三倍体個体} / \text{獲得種子数}$

2. ‘徳島3X1号’ および二次選抜系統

1) ‘徳島 3X1 号’

1992年にHS4と緑香系との交配により得られた三倍体スダチ。1996年に初結実した。無核で多汁の高品質果実であったため、その年に二次選抜系統とした。また、翌年より県内スダチ産地の10戸の栽培農家にて現地試験を行い、優秀性が認められたため、2001年7月に種苗法に基づく品種登録申請を行い、2004年6月4日に登録された（登録番号：第12068号，登録品種の名称：徳島3X1号）。

‘徳島 3X1 号’の樹勢は中庸で，樹の大きさは中，生育初期および徒長枝の刺は大きく長い（第12図）が，着果枝では次第に短くなる傾向がある（第13図）。また，結花当初の花弁は3～5枚で不安定であるが，やがて5枚花弁で安定する（第14図）。



第12図 生育初期の‘徳島 3X1 号’の刺



第13図 ほとんど刺が消失した‘徳島 3X1 号’の着果枝

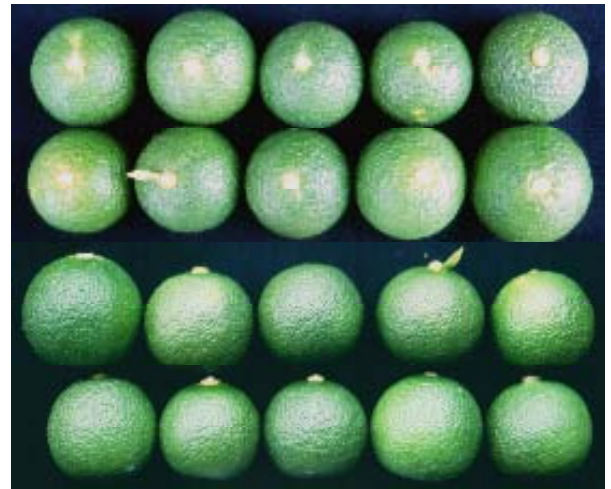


第 14 図 ‘徳島 3X1 号’ の正常花

果実の着果性は良く生理落下も少ない。また、バラ成り傾向で密着果も少ない（第 15 図）。果実の大きさは本田系と同程度で、果皮はやや粗く厚いため、外観は本田系よりもやや劣る（第 16 図）。しかし、ほぼ完全無核であり、果肉は鮮やかな緑色で非常に美しい（第 17, 18 図）。



第 15 図 ‘徳島 3X1 号’ の着果状態



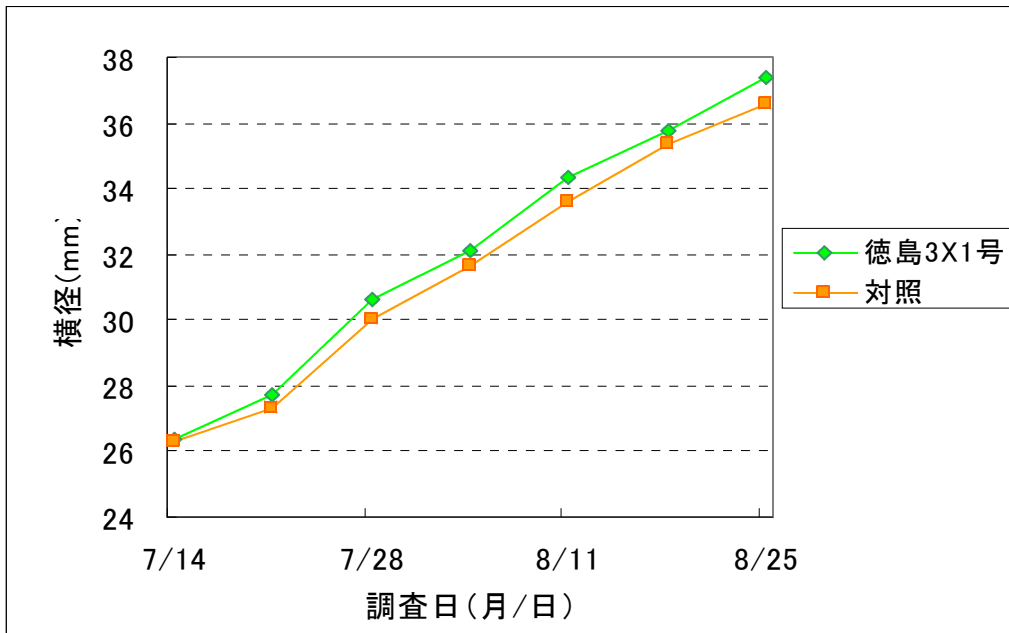
第 16 図 やや腰高で果皮がやや粗い
‘徳島 3X1 号’ の果実



第 17 図 5 方向からみた ‘徳島 3X1 号’ の果実



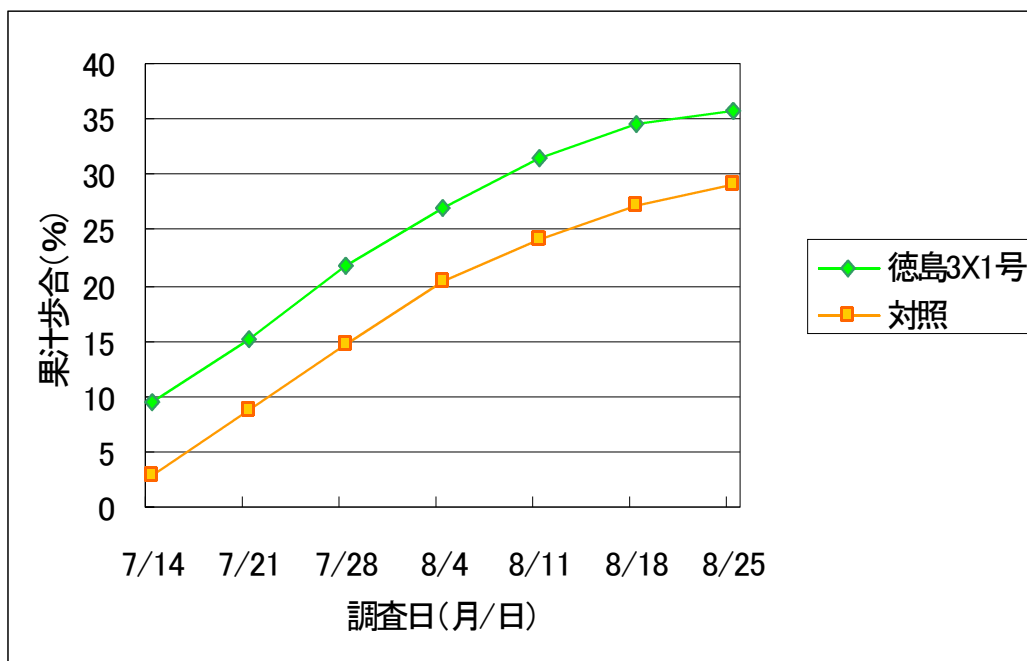
第 18 図 無核で鮮やかな緑色の果肉が特徴的な ‘徳島 3X1 号’



第 19 図 ‘徳島 3X1 号’ の横径の推移

‘徳島 3X1 号’ および対照とも 4 園地 3 年間の平均値を示した。

対照は本田系，徳島 1 号，神山 4 号



第 20 図 ‘徳島 3X1 号’ の果汁歩合の推移

‘徳島 3X1 号’ および対照とも 4 園地 3 年間の平均値を示した。

対照は本田系，徳島 1 号，神山 4 号

また，果実肥大は本田系よりやや早いか，もしくは同等であるが（第 19 図），果汁歩合が本田系より常に高く推移し，7 月下旬～8 月上旬には出荷が可能となる（第 20 図）．関係者および試作農家による品質検討会においても果実品質の評価は高く，香りについては現存するスダチとほとんど変わらないという意見と，よりフレッシュでフルーティーであるという意見が聞かれた．酸味に関してはややマイルドに感じられるという意見が多かった．基本的に完全無核であるが，まれに小粒の不完全種子を含むことがあり（第 21 図），ハッサクやユズなどの稔性の強い花粉を強制的に受粉すると，1～2 個の完全種子と数個の不完全種子とを含むことがあった（第 22 図）．結実性も良く，隔年結果性は認められなかった．



第 21 図 不完全種子（しいな）を含んだ‘徳島 3X1 号’の果実



第 22 図 ハッサク花粉の強制受粉により完全種子を含んだ‘徳島 3X1 号’の果実

2) 上板 8 号

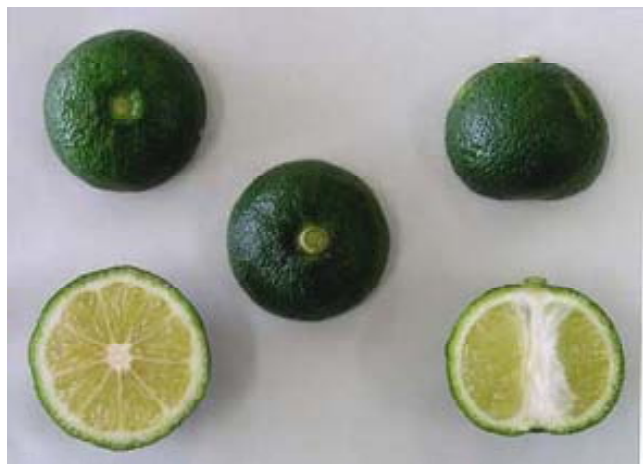
1992 年に徳島 1 号に HS4 を交配して得られた三倍体スダチ。2000 年に初結実した。樹勢はやや弱で、三倍体スダチのなかではかなり弱く、トゲも小さい。上板 8 号の収穫期は9月中下旬では本田系と比べてかなり遅く、同時期に収穫できる上板 6 号よりも果実の成熟は遅い。ほぼ完全な無核で果汁歩合が高く、不完全種子もほとんど混入しないが、果肉色がやや黄色いのが問題点であると思われる（第 23 図）。

3) 上板 9 号

HS4 に本田系を交配して得られた三倍体スダチ。2001 年に初結実した。上板 9 号は本田系よりも果汁歩合が高く推移するだけでなく、果実の肥大も早いため、‘徳島 3X1 号’よりさらに早く収穫することが可能である。現存するスダチの系統では最も収穫期が早い。樹勢は強く太く長いトゲがある。果実の外観は三倍体スダチの選抜系統の中では最も二倍体スダチに近い。上板 8 号と同様にほぼ完全無核で不完全種子の混入も少ないが、果肉色は‘徳島 3X1 号’よりも淡い（第 24 図）。



第 23 図 晩生の上板 8 号の果実



第 24 図 極早生の上板 9 号の果実

4) 上板 10 号

1992 年に HS4 と本田系との交配で得られた三倍体スダチ。2003 年に初結実した。まだ調査中で正確な収穫期は把握していないが、おそらく本田系とほぼ同時期であると思われる。樹勢はやや強く、強いトゲが発生する。基本的に無核であるが、まれに完全種子や不完全種子が混入する。果実は多汁で果肉色も緑色であり果実品質は良い（第 25 図）。標準的の時期に収穫できるな無核スダチとして期待できる。

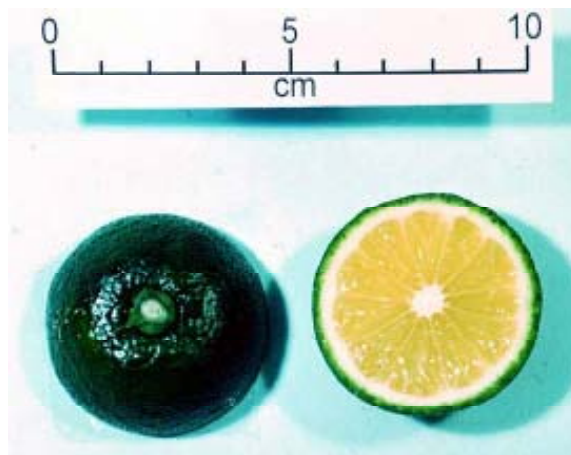
5) 上板 5 号

1992 年に HS4 と山根系ユズとの交配により得られた三倍体。1997 年に初結実した。上板 5 号の果実はやや小さいユズ程度の大きさで、無核ユズの多田錦より大きかった。外観

はユズに似ていたが，果面はユズよりも光沢があった（第 26 図）．ほぼ無核で果汁歩合がかなり高く，スダチとユズの中間的な香りを有していた．スダチと同じ時期から果汁歩合が高くなり，収穫適期は 9 月頃である．また，完全着色するとスダチと同様に浮皮になる．果実は高品質であるが，今後の方向性が課題である．



第 25 図 今後に期待される上板 10 号



第 26 図 上板 5 号の果実

3. 三倍体スダチおよび三倍体香酸カンキツの果実分析

1992～1994 年度の交配によって得られた三倍体のうち，2004 年度までに結実したのは 9 系統であった（第 3 表）．これらの分析データは全て高接樹のものであるが，そのうち現在までに圃場に定植した原木が結実したのは‘徳島 3X1 号’と上板 5 号のみであった．しかも上板 5 号の原木が結実したのは一度だけであった．

第 3 表 結実した三倍体の交配組み合わせおよび樹体調査

系統名もしくは 個体番号	種子親	花粉親	樹勢	トゲの 大きさ	収穫期	初結実 (年)
徳島3X1号	HS4	緑香	中	大	7月下旬～8月中旬	1996
上板8号	徳島1号	HS4	やや弱	小	9月下旬～10月上旬	2000
上板9号	HS4	本田系	やや強	大	7月中旬～8月上旬	2001
上板10号	HS4	本田系	中	中	— ^z	2001
4×T1 92-33	HS4	徳島1号	中	中	—	2001
4×T1 92-1	HS4	徳島1号	やや強	極大	—	2001
4×N 92-18	HS4	新居系	やや強	中	—	2001
4×N 92-43	HS4	新居系	中	大	—	2003
上板5号	HS4	山根系	強	極大	9月中旬～10月中旬	1997
本田系スダチ			やや弱	小	8月中旬～9月中旬	
新居系スダチ			弱	極小	9月上旬～9月中旬	
山根系ユズ			強	極大	10月下旬～11月下旬	
多田錦			強	大	10月下旬～11月下旬	

z: 未判定

第4表 結実した三倍体の果実形質

系統名 もしくは 個体番号	調査日 (月/日)	果実重 (g)	横径 (mm)	縦径 (mm)	果皮色	果肉色	果皮厚 (mm)
徳島3X1号	8/13	20.3	36.4	29.8	暗緑	明黄緑	3.1
上板8号	9/22	23.4	38.9	29.5	暗緑	浅黄	3.8
上板9号	8/13	21.9	36.2	31.2	暗緑	明緑黄	3.1
上板10号	8/27	23.4	38.1	30.0	暗緑	鮮黄緑	2.8
4×T1 92-33	8/27	17.1	33.0	29.0	暗緑	浅緑	3.0
4×T1 92-1	8/27	24.8	38.8	29.0	暗緑	明緑黄	3.0
4×N 92-18	8/27	40.8	45.5	39.8	濃黄味緑	明緑黄	5.4
4×N 92-43	8/27	45.0	46.8	39.8	濃黄味緑	明黄	4.6
上板5号	9/19	51.1	48.8	42.7	暗緑	浅黄	4.4
本田系スダチ	8/27	24.0	37.5	31.4	暗緑	浅黄緑	2.8
新居系スダチ	8/27	12.6	30.2	24.5	濃黄味緑	浅黄緑	2.4
山根系ユズ	9/19	61.4	51.6	44.5	暗緑	浅黄	4.5
多田錦	9/19	31.3	41.8	34.8	暗緑	浅黄	3.8

系統名 もしくは 個体番号	完全 種子 (個)	不完全 種子 (個)	果汁 歩合 (%)	Brix (%)	クエン酸 (%)	香り
徳島3X1号	0.0	0.4	32.4	8.0	6.66	スダチ
上板8号	0.0	0.0	31.4	9.2	6.90	スダチ
上板9号	0.0	0.2	38.0	7.9	6.53	スダチ
上板10号	0.0	0.6	38.6	8.9	6.40	?z
4×T1 92-33	0.0	0.4	0.0	—y	—	
4×T1 92-1	0.0	0.8	34.0	8.0	6.08	?
4×N 92-18	0.1	5.8	23.8	9.0	5.76	?
4×N 92-43	0.0	23.6	28.1	9.0	6.30	?
上板5号	0.5	0.0	37.7	7.7	5.15	ユズ・スダチ
本田系スダチ	8.6	1.4	26.2	8.2	6.63	スダチ
新居系スダチ	0.4	0.0	28.8	8.0	6.68	スダチ
山根系ユズ	36.2	0.2	15.8	8.9	4.28	ユズ
多田錦	0.4	0.4	35.1	9.5	5.52	ユズ

z: 香りの識別が困難, もしくは香りがない

y: 果汁がなく測定不能

収穫期については4系統の調査であるが、本田系と同等（上板10号）、本田系よりも早い（‘徳島3X1号’、上板9号）もしくは遅い（上板8号）時期であり、バラエティーに富んでいた。上板8号は本田系と同様に樹勢はやや弱でトゲは小さかったが、それ以外の三倍体系統は本田系に比べて樹勢はより強く、トゲは大きかった（第3表）。三倍体スダチの果実の大きさは本田系と同等、もしくはそれより大きくなる傾向が見られ、果皮は厚くなった。果皮色には大きな変化はなかったが、果肉色は変化に富んでいた。全ての三

倍体果実には多少の不完全種子が形成されるものの、完全種子はほとんどなかった。4×T1 92-33 は全く果汁がなかったが、他の 7 系統の果汁歩合は本田系と同等かもしくはそれ以上であった（第 4 表，第 27 図）。

第 27 図

三倍体スダチの果実

（左から：‘徳島 3X1 号’，上板 8 号，上板 9 号，4 × N 92-18，4 × N 92-43，本田系，新居系）



4. 雑種四倍体の獲得とその後代

1992 年に本田系スダチと HS4 との交配により四倍体を得られた。この四倍体の葉の形質は本田系とも HS4 とも僅かに異なっていた（第 28 図）。また，1998 年に初結実した果実は本田系よりも小さく，果皮が滑らかで油胞方が大きく，スダチの香りを有していた。また数個の種子を含み，それらは全て単胚であった（第 29 図）。さらに，この個体に本田系スダチの花粉を交配したところ，得られた後代は全て三倍体であった。この系統は今後有用な中間母本として利用できるため，二次選抜系統とした（系統名：HS4T1）。



第 28 図 HS4T1 と両親との葉の形質



第 29 図 単胚種子を含む HS4T1 の果実
（左から：本田系，HS4T1，HS4）

考察

二倍体×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）．本実験においても二倍体を種子親に用いた場合はほとんどが不完全種子であり，同様の結果であった．また，それらの組合せの場合，三倍体がほとんど得られず（第 1 表），実用性は低いように思われた．四倍体を種子親に用いた場合，1 種子につき平均 3～4 個体の健全な植物体を得られたが，二倍体を種子親に用いた場合は，1 種子につき 1 個体程度しか完全な植物体を得ることができなかった．二倍体を種子親に用いた場合の三倍体獲得率が低かったのは，このように発根および発芽率が悪かったことと，Esen・Soost（1972, 1973）らが明らかにしているように，カンキツ二倍体×四倍体から出現する倍数性植物について，三倍性胚はその大部分が胚発生の過程で退化することの両方に原因があるのではないかと思われる．

また，本実験の四倍体×二倍体ではある程度の三倍体を得ることができた．ただ，新居系を花粉親に用いた場合に三倍体を得にくかったのは，新居系の花粉量が本田系の約 1/10 程度しかないうえに，花粉稔性は約半分以下と低いことに原因があると思われる．またレモンを用いた場合にも三倍体獲得率が低かったのも，本来レモンは種子形成能力が低く含核数も少ないことが影響していると思われる．三倍体獲得率は緑香系スダチや山根系ユズを花粉親に用いた場合に高かったのは，これらの花粉稔性が高いことが原因だと考えられるが，同じく花粉稔性の高い海野系ユズとそれより花粉稔性の落ちる徳島 1 号との三倍体獲得率がほとんど同じだったことから，これらの差は誤差の範囲内であると考えられる．それらを花粉親に用いてもスダチが多胚性であるために，三倍体の獲得率は必ずしも効率的であるとは言えない．しかし，四倍体スダチと二倍体スダチとの 768 花の交配から 63 個体の三倍体系統が得られ，現在 8 系統しか結実していないにもかかわらず，その中から 1 品種を育成することができた．さらに今後有望な 3 系統が得られていることから，本実験の方法は無核スダチの育成には充分実用的であると思われる．

他の香酸カンキツとの交配では，ユズの結果年齢が遅いこともあり未だ 1 系統しか結実しないが，その上板 5 号は高品質である．さらにある程度の三倍体が結実しなければ断言することはできないが，今までにない新しい無核の香酸カンキツを育成するうえでも倍数生育種は有効な方法であると思われる．

金好ら（1997）も二倍体と四倍体との交配によって雑種性四倍体を得ている．本実験で得られた HS4T1 も染色体数，葉の形質，果実の形質からも雑種性四倍体であることは明らかである．さらに，この HS4T1 は単胚性であり，二倍体との交配によって確実に三倍体を得ることができた．この HS4T1 を交配母本に用いることにより，今後の育種効率は飛躍的に向上するものとして期待される．

以前から多くの研究者が三倍体を利用した無核性品種の育成研究に取り組んできたが，現在までに実用化されたのはアメリカの 'Oroblanco' (Soost・Cameron,1980)，'Melogold' (Soost・Cameron, 1985) および独) 果樹研究所育成の三倍体キンカン 'ぷちまる' (吉田ら，2000)

くらいで、あまり実用化はされていない。その原因として、カンキツが三倍体化すると樹勢が強くなること（第 2 表）や、果皮が厚くなることが考えられ（第 3 表）、生食用カンキツとしては欠点となる形質が多いこと、優秀な形質を持つ単胚性の四倍体がなかったことなどが考えられる。また、単胚性で雄性不稔遺伝子を持つ‘清見’（西浦ら、1983）が育成され、‘清見’を種子親として数多くの交配がおこなわれている。さらに‘清見’の次世代は優秀な系統が多く、現在までに数多くの無核品種が育成されている（吉田、2003）。不良な形質を伴う可能性がある三倍体を作成するよりも、‘清見’を用いて無核性の二倍体を育成した方が効率が良いのも大きな理由であると思われる。また、顕微鏡下での染色体数調査による倍数性の識別にはかなりの労力と時間が必要であった事も、三倍体育種が実用的にならなかった原因の一つであろう。

ユズ、スダチおよびカボスなどの無核品種を育成する場合、それらの香り形質の発現が最も重要である。そのため、珠心胚実生の変異や芽条突然変異などによる無核個体の選抜が考えられるが、育種効率は非常に悪い。交雑育種を行う場合は、同種または近縁種間の交配が望ましいが、香酸柑橘類の無核に関する遺伝資源は皆無に等しい。そうであるとはいえ、無核形質をもつタンゴールの清見もしくはその遺伝子を受け継ぐ品種は、次世代の香りを考えると交配親に適さない。一方、倍数性の識別はフローサイトメーターを用いて容易に行えるようになり（竹中ら、1997；Miranda ら、1997）、多胚性カンキツにおいても三倍体の選抜効率が飛躍的に向上した。また、香酸カンキツの場合、その利用特性上果皮が厚いことは欠点とならず、むしろ果皮が厚くなることによって、棚保ち性が向上し香りが強くなるなど、利点となることもある。

また、一般的に三倍体品種は、種子ができないためにそれ以上の改良ができないと思われているが、三倍体に大量の花粉を受粉することで、数個の完全種子が得られることが判った。交雑実生は二倍体か三倍体あるいは異数体であると推察できるが、多胚性のためにほとんどが珠心胚実生の三倍体であると思われる。もし、交雑実生が三倍体であれば、珠心胚実生との識別は困難である。したがって、三倍体を交配親に用いることは実用的ではないが、そらの種子を珠心胚育種や人為突然変異育種に用いることは可能である。

以上のような点からも三倍体を利用した無核品種の育成は、スダチのみならずユズやカボスなどの香酸柑橘類において非常に有効な手段であるといえるだろう。さらに今回の実験のように副産物として単胚性四倍体を得ることができれば、多胚性香酸カンキツの育種効率が飛躍的に向上することであろう。

本研究により得られた‘徳島 3X1 号’は無核で高品質果実生産が期待されるだけでなく、収穫期が 7 月下旬～8 月上旬と早く、需要の高いお盆前に出荷できること、農家の収穫労力の分散、経営規模の拡大等に寄与するものとして期待されている。また、‘徳島 3X1 号’の苗木は、2005 年の春から徳島県スダチ・ユコウ普及推進協議会を通じて県内農家に供給され、8000 本以上の苗木が定植される予定であり、今後も栽培の増加が見込まれている。

第3章 細胞融合による育種素材の作出

緒言

近年、果樹農家では作業従事者の高齢化や担い手不足が最も深刻な問題となっており、作業の機械化や省力化等が活発に論議されている。育種的手法で農作物に遺伝的な病害虫抵抗性を付与することができれば、農薬散布回数を減らすことが可能となり、労働の省力化のみならず作業従事者の健康問題や低コスト化による収益性の向上にもつながるであろう。

スダチおよびユズは共に徳島県特産の香酸カンキツであり、近縁であるとされている。しかし、ユズはかいよう病 (*Xanthomonas campestris* pv. *citri*) に対して非常に強い抵抗性を示すのに対して、スダチはユズほど強くなく (松本・奥代, 1990), スダチ栽培におけるかいよう病の防除は最も重要な作業の一つとなっている。一方、スダチはカンキツトリステザウイルス (*citrus tristeza virus* : CTV) に対して抵抗性を示すのに対して、ユズは罹病性であり (宮川, 1971), 萎縮症やかいよう性こはん症を引き起こし、ユズ果実の秀品率を下げる最も大きな要因の一つとなっている。さらに、ユズはヤノネカイガラムシ (*Unaspis yanonensis* Kuwana) に絶対的な抵抗性を示すが、スダチには抵抗性がない (西浦・上野, 1973)。

前項で述べたように、徳島県果樹研究所では様々なアプローチで香酸カンキツ類の育種を行ってきており、病害虫抵抗性の付与も重要な目的の一つである。ただ、香酸カンキツ間の交雑育種 (小池, 1988, 山尾ら, 1993) では、香酸カンキツについて最も重要な微妙な香りを受け継ぐ雑種を得るのは困難なばかりか、多胚性の品種では交雑胚の獲得率も低く、香酸カンキツ育種のネックとなっている。

一方、カンキツのプロトプラスト融合は、Ohgawara (1985) らによってオレンジとカラタチの体細胞雑種 ‘オレタチ’ が報告されて以来、様々な組み合わせで行われてきており、両親の核遺伝子を安定して保有し (Grosser ら, 1988 ; Grosser ら, 1990 ; Kobayashi ら, 1988 ; Ohgawara ら, 1989), 三倍体育成のための交配母本として用いることができることを示している (Kobayashi ら, 1995)。また、電気融合法 (Hidaka ら, 1992 ; Shinozaki ら, 1992 ; Takayanagi ら, 1992) により、当初用いられていたポリエチレングリコールを用いる方法よりも技術的に容易で効率的な体細胞雑種の作出が可能となっている。

また、プロトプラスト融合は、体細胞雑種だけでなく細胞質雑種を作出することも可能であり、Verdi ら (1987) は非対称融合によって、カンキツ属の核とキンカン属もしくはミクロシトラス属の細胞質を持つ細胞質雑種を初めて作出した。Saito ら (1993) はスダチとレモンもしくはライムとの電気融合により細胞質雑種を得ている。Moriguchi ら (1996) は特定の組合せによって高確率に細胞質雑種が得られることを報告している。

雌雄性不稔と単為結実によってもたらされる無核果実の生産は柑橘産業にとって最も重要な形質の一つである。多くの高等植物では、雄性不稔は細胞質と核との相互作用で起こ

り (Kaul, 1988), 雄性不稔に関する遺伝子はミトコンドリア DNA (mtDNA) にコードされている (Leaver and Gray, 1982; Whitfield and Bottomley, 1983) ことが知られている。カンキツでは, ウンシュウおよび‘アンコール’ (キング×地中海マンダリン) が細胞質雄性不稔遺伝子を持っていると考えられている (Iwamasa, 1966; 山本ら, 1992)。ゆえに, 不稔細胞質をもつ細胞質雑種は雄性不稔のメカニズムを解明する上で有用であると思われる。しかし, 雄性不稔遺伝子を持つと思われる品種または系統の細胞質雑種は, 今までに 1 個体しか報告されていない (Yamamoto and Kobayashi, 1995; ウンシュウの細胞質とスウィートオレンジの核を持つ細胞質雑種)。

本研究では, 病虫害抵抗性を併せ持ち, それぞれの香りを受け継ぐ新しい香酸カンキツもしくは優良な育種母本を育成するために, 電気融合法を用いてスダチとユズの体細胞雑種を作出した。また, ウンシュウの細胞質とユズもしくはレモンの核を持つ細胞質雑種を作出し, これらのミトコンドリア DNA の再編成を観察した。さらにこれら体細胞雑種および細胞質雑種の種子形成能力および CTV 抵抗性を調査し, 新たな知見を得たのでここに報告する。

材料および方法

1) 珠心胚由来カルスの誘導とプロトプラストの単離

本田系スダチ (*Citrus sudachi hort. ex Shirai*) のカルスは開花直前の胚珠から sucrose 50g/l, benzylaminopurine (BA) 10mg/l, 寒天 8g/l を含む Murasige and Tucker (MT) 固形培地, pH 5.8 でカルスを誘導し, sucrose 50g/l, kinetin 20mg/l, gellan gum 3g/l を含む MT 固形培地, pH 5.8 で 1 ヶ月毎に継代した。十万ウンシュウ (*C. unshiu Marc.*) カルスは胚培養過程で派生したカルスを用い, sucrose 50g/l, kinetin 10mg/l, gellan gum 3g/l を含む Murashige and Skoog (MS) 固形培地, pH 5.7 で 1 ヶ月毎に継代した。これらカルスはホルモンフリー基本培地に移植すると胚形成し, 親と同じ植物体を形成することを予め確認した。なお, スダチとユズとの体細胞雑種の作出においては全てのステージで MT 培地を用い, ウンシュウとユズもしくはレモンの細胞質雑種の作出においては MS 培地を用いた。継代培養と同組成の MT (もしくは MS) 液体培地で振盪培養 (120rpm) し 2 週間毎に継代培養したカルスをプロトプラスト採取 1 週間前からホルモンフリーの MT (MS) 液体培地に移した。得られた約 1g のカルスに, macerozyme R-10 0.3%, cellulase onozuka R-10 0.3%, dricelase 0.1%, mannitol 0.35M, sorbitol 0.35M を含む 1/2 MT (MS) 培地, pH 5.6 の酵素液を加え, 人工気象機内 (25℃) で約 16 時間静置し, プロトプラストを単離した。

2) ユズおよびレモン葉肉からのプロトプラストの単離

室内で栽培しているユズ (*C. junos Sieb. ex Tanaka*) およびレモン (*C. limon Burm. f.*) の展開したばかりの比較的柔らかい葉 3 ~ 4 枚を 75% アルコールに数秒間浸した後, 0.1% Tween20 を含む 1% 次亜塩素酸溶液で 20 分程度滅菌した。葉を 1 ~ 2mm 位に細かく切り,

0.7M Mannitol に 1 時間浸漬した後, MacerozymeR-10 0.3%, Cellulase onozuka R-10 3.0%, MES 1mM, Mannitol 0.35M, Sorbitol 0.35M を含む 1/2 MT (MS) 培地, pH 5.6 の酵素液を加え, 暗黒化の人工気象機内 (25 ℃) で約 16 時間振盪 (20 ~ 30rpm) し, プロトプラストを単離した.

3) プロトプラストの電気融合

酵素処理により得られたカルスおよび葉肉由来の各プロトプラストを 40 μ m のナイロンメッシュで濾過し, mannitol 0.35M, sorbitol 0.35M, CaCl₂ 0.25M, pH 5.6 の懸濁液で 5 × 10⁵ 個/ml および 1 × 10⁶ 個/ml に調節し, 等量混合した. 融合装置は島津社製 SSH-2 を, 融合チャンバーは同社製 FTC-34D5 を用い, 高周波電界条件は交流周波数 1MHz, 電圧 25V, 印加時間 60 秒, 直流パルス印加条件は直流パルス電圧 250 ~ 300V, パルス幅 50 ~ 80 μ s, パルス印加の間隔 0.5 秒, パルス印加数 3 ~ 5 回の条件で融合を行った.

4) プロトプラストの培養と植物体の再生

融合処理を行ったプロトプラストを sucrose 0.15M, glucose 0.45M, glutamine 0.05%, gellan gum 0.25% の溶液で 2 × 10⁵ 個/ml に調節した後, 同様の糖組成で 2 倍の無機塩類を含む等量の MT (MS) 培地に滴下し, 照明条件を最初の 2 週間は 100Lux 以下, 以後 1000Lux 以上とし, 25 ℃ で培養した. 培養により得られた胚様体を maltose 50g/l, malt extract 500mg/l, adenine 40mg/l, gellan gum 10g/l を含む MT (MS) 培地, pH 5.8 (胚様体育成培地) で育成し, 次いで sucrose 20g/l, gibberellin A₃ 10mg/l, gellan gum 5g/l を含む MT (MS) 培地, pH 5.8 (発芽培地) で発芽させた. さらに sucrose 20g/l, NAA 0.05mg/l, gellan gum 2g/l を含む MT (MS) 培地, pH 5.8 (発根培地) で発根させ再生植物体を得た.

5) 葉形質の調査

得られた完全な植物体は暗黒条件下で 5cm 程度に生育させたカラタチ実生に割接し, 5 ℃ 14 時間日長の室内で順化を行った. 本葉が完全に展葉した後, 両親との外観的な葉の形質比較を行った.

6) 染色体数の識別

根端, 生長点を取り出し生山ら (1981), および片岡ら (1991) の方法を一部改変した押しつぶし法で染色体数を観察し, のちに Miranda ら (1997) の方法に従いフローサイトメーターにて倍数性を再確認した.

7) DNA 検定

Rogers and Bendich (1985) の方法 (CTAB 法) に従って総 DNA を抽出した. 1 μ g の DNA を制限酵素で切断し, 1% agarose gel で電気泳動後, Southern (1975) の方法に従って, nitrocellulose filter もしくは nylon membrane に転写した.

イネのリボゾーム DNA (rDNA) 配列を含む pRR217 plasmid (Takaiwa ら, 1984), *Nicotiana tabacum* の葉緑体 DNA (cpDNA) 断片を含む pTBa1 plasmid (Sugiura ら, 1986) および *Brassica campestris* のミトコンドリア DNA (mtDNA) を *Pst* I もしくは *Sac* I で切断した DNA クローン (Palmer and Shields, 1984) をプローブとした. pRR217, pTBa1 Plasmid および mtDNA clone はそれぞれ大野博士, 杉浦博士および J. D. Palmer より譲り受けた. rDNA および cpDNA のラベリングと検出は ECL 法 (Amersham) で, mtDNA の検定は DIG-AMPPD システム (Boehringer Mannheim) で行った.

8) 種子形成能力の調査

開花した個体については, アセトカーミン染色により 200 個/花の花粉稔性を 3 花調査し, 花粉量および柱頭の形態については目視の観察で行った. また, 他の花粉が受粉しないように袋掛けを行い, 果実の種子数について調査した.

9) CTV 抵抗性調査

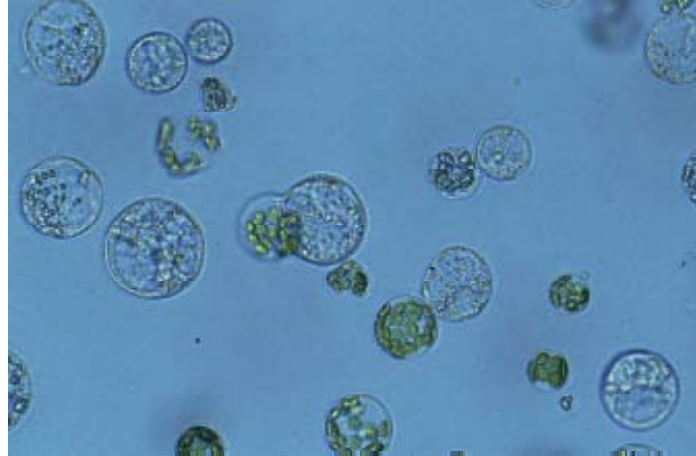
体細胞雑種および細胞質雑種の複製をそれぞれ育成し, 各系統 2 株に CTV 強毒系統を接木接種した. 接木から 2 年後に新葉を採取し, ELISA 法により全株 CTV 強毒系統の保毒を確認した. さらに各株全枝を採取剥皮し, 10cm 毎にステムピットィング (SP) の発生状況を程度別に調査した. 調査は果樹母樹ウイルス病検査実務参考に準じた. すなわち, 無: 発生が認められない. 軽: ごく小形又は微細な条線状のピットィングが 1~数個散見される. 中: 比較的小形のものがかなり広範囲にわたって生ずるか, あるいはごく一部に比較的大形のものを 1~数個生ずる. 甚: 大小各様のものが広範囲にわたって生ずる. とし, $SP \text{ 発生病度} = \text{軽} \times 1 + \text{中} \times 3 + \text{甚} \times 5 / \text{調査本数} \times 5 \times 100$ の計算式で SP 発病度を計算した.

結果および考察

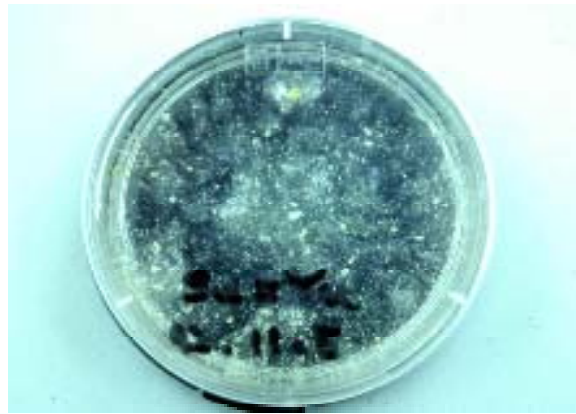
1. スダチとユズとの細胞融合

今回使用したプロトプラスト融合条件での融合率は約 5%であり, そのうちシングルペア率は 90~100% で, バーストはほとんど観察されなかった. なお高周波電界条件の電圧および印加時間を増やすと, 融合率の増加が観察されたがシングルペア率は減少した. また直流パルス印加条件の直流パルス電圧, パルス幅およびパルス印加数を増やすと融合率は増加したが, バースト率も増加した.

ヘテロカリオンの融合細胞 (第 30 図) は培養 2 週間後には初期分裂が始まり, 3 週間後にはコロニーが形成され始めた. コロニーは 1 ヶ月後には肉眼で確認できるくらいまでの大きさに発育した. 約 2 ヶ月後には緑色胚様体が観察され始め (第 31 図), 5 ヶ月後には直径約 2mm 程のハート型もしくは球型をした緑色胚様体が形成された.



第 30 図 スダチとユズとの細胞融合で得られたヘテロカリオンの融合細胞
(緑：ユズプロプラスト，透明：スダチプロトプラスト)

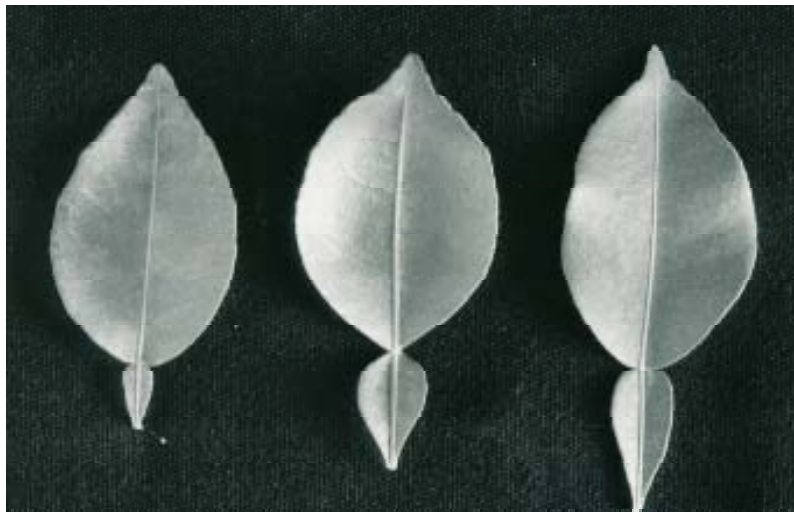


第 31 図 スダチとユズとの細胞融合処理後形成されたコロニーと緑色胚様体

緑色胚様体は胚様体育成培地で約 1 ヶ月培養し，5 ～ 10mm 程度に生長させ，発芽培地に移植した．移植した胚様体は約 1 ヶ月後には発芽し始め，それらを発根培地に移植したところ，約 1 ヶ月後には発根し，9 個体が完全な植物体にまで生長した (SY1 ～ SY9)．それらは暗黒化で生育させたカラタチに割接し順化した (第 32 図)．20cm 位にまで生長した再分化個体の葉の形質を比較したところ，両親であるスダチおよびユズとの中間の葉形質をしていた (第 33 図)．また葉は厚く葉色が濃い等の四倍体に特徴的な形質を持っていた．さらに茎の生長点の染色体数を観察したところ， $2n=36$ の四倍体であった．

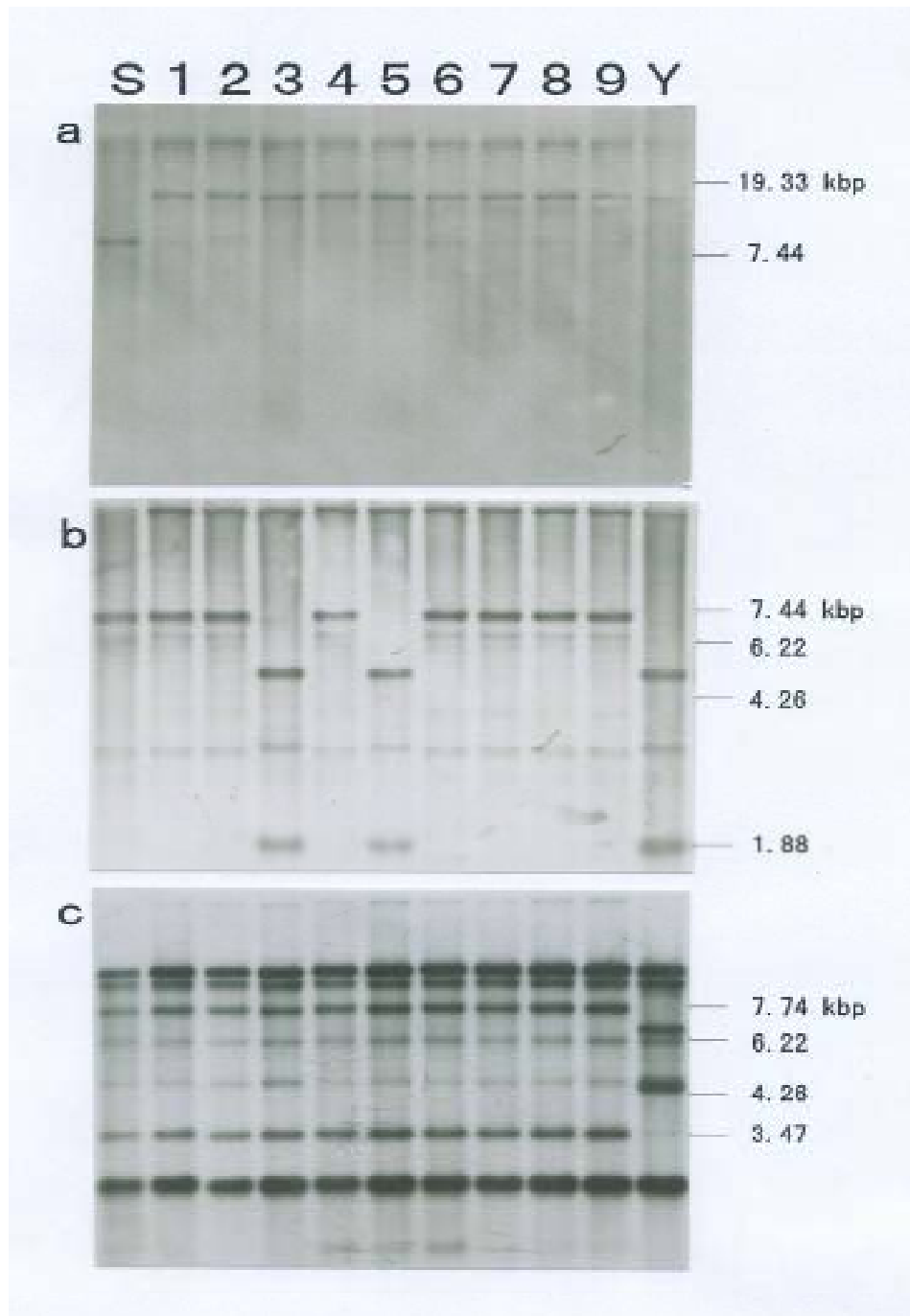


第 32 図 カラタチに割接し，順化したスダチとユズとの
細胞融合で得られた再分化植物



第 33 図 スダチとユズとの細胞融合で得られた植物と両親との葉形質の比較
(左から：スダチ，再分化植物，ユズ)

イネ rDNA をプローブに用いた Southern 解析では 9 個体全てがスタチおよびユズに特徴的なバンドを全て保有していた (第 34a 図)。以上のことから、これらの 9 個体は全てスタチとユズの体細胞雑種であると思われた。また cpDNA をプローブに用いた場合は、スタチもしくはユズどちらかと同じバンドパターンを示し、両方のパターンを持つ個体はなかった (第 34b 図)。またそれらの分離比は 3.5 : 1 であった。



第 34 図 スタチとユズとの細胞融合により得られた植物体のサザン解析
 a. rDNA probe, *Pst* I digests b. cpDNA probe, *Pst* I digests c. mtDNA prebe, *Eco* R I digests

Vardi ら (1989) は, *Microcitrus* と *Citrus* との細胞質雑種において, 葉緑体の捨択一はカルスの段階で既に完了しており, 再分化するまで安定していることから, 葉緑体はかなり早い生育ステージで選択されているとした. Kobayashi ら (1991) もまた, navel orange (*C. sinensis* Osb) と Murcott tangor との体細胞雑種の葉緑体は約 1 : 1 に分離したことから, heterokaryons から正常な植物体に分化する過程で片親の葉緑体がランダムに排除されるとしている. 一方, Motomura ら (1996) は, *Citrus* と *Micrositrus* との体細胞雑種を作出し, cpDNA の再編成もしくは組み換えを観察している. 本実験で作出した体細胞雑種はどちらか一方と同じバンドパターンを示し, Kobayashi ら (1991) と同様の結果となった. しかし, cpDNA 検定においては, 1 種類のプローブしか用いていないため, 再編成が起こっていないと断言することはできないだろう.

mtDNA の検定においては, *B. campestris* のミトコンドリアゲノム断片 3 種類, P5.7, P9.7, S8.3 をプローブに用いた. どのプローブを用いたときも, 全ての体細胞雑種はカルス親であるスダチと同じバンドパターンを示し, 葉肉親であるユズ固有のバンドを示す個体はなかった (第 34c 図). 多くの実験において, mtDNA は安定して保持されると報告されており (Kobayashi ら, 1991; Ohgawara ら, 1994; Saito ら, 1994), Kobayashi ら (1991) は, ネーブルオレンジと ‘マーコット’ タンゴールとの体細胞雑種において, 11 種類の mtDNA probe を用いたにも拘わらず, カルス親と同じバンドパターンしか得られなかった. 一方, mtDNA の再編成は属間での体細胞雑種 (Motomura ら, 1995) や属間もしくは属内での細胞質雑種 (Vardi ら, 1989; Moriguchi ら, 1997) において報告されており, Vardi ら (1989) は, mtDNA の取捨択一は遅い過程で起こるとしている. 本実験では 3 種類の mtDNA プローブを用いて southern blot 解析を行ったが, mtDNA の再編成は確認できず, Kobayashi ら (1991) の考察を支持する結果となった. また未だに属内の体細胞雑種において mtDNA の再編成が確認されていないのは興味深い結果であるが, これらの違いを明らかにするにはさらなる調査が必要であろう.

体細胞雑種は四倍体であるため果皮が厚くなり, 国内の生食用果実としての商品化が難しい事は報告されている (Kobayashi ら, 1995) が, 二倍体と交配することによって, 四倍体より商品価値が高いと思われる三倍体の作出が可能であり, 第 1 章において香酸カンキツ類の三倍体の有効性を示した. 本実験で得られたスダチとユズの体細胞雑種も, 三倍体の無核香酸カンキツを育成する為の重要な育種母本になることが期待される. ウンシュウのように果皮を剥いて食べるカンキツでは, 果皮が厚く剥皮性が悪いことは致命的な欠点であるが, ユズのように果皮を料理に用いたり, スダチのように果汁を絞って利用する香酸カンキツでは, 果皮が厚くなるという四倍体の欠点もさほど気にならず, 品質が良ければ体細胞雑種自体が品種になる可能性もあるだろう.

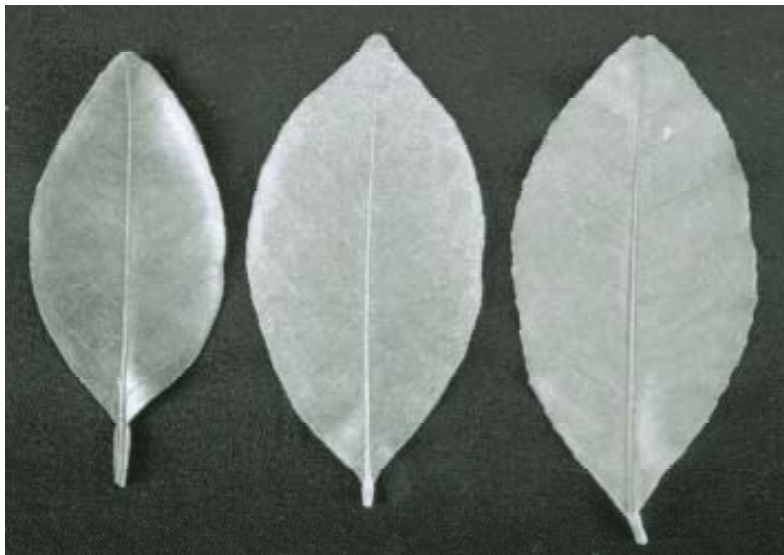
2. ウンシュウとユズもしくはレモンとの細胞融合

ウンシュウとユズとの細胞融合処理から約 5 ヶ月後には約 60 個の緑色胚様体を得られ,

2 個体が完全な植物体に生長した (JY1 および JY2). ウンシュウとレモンの組合せでは 15 個の緑色胚様体が得られ, 4 ヶ月後には 1 個体の植物体が得られた (JL1).

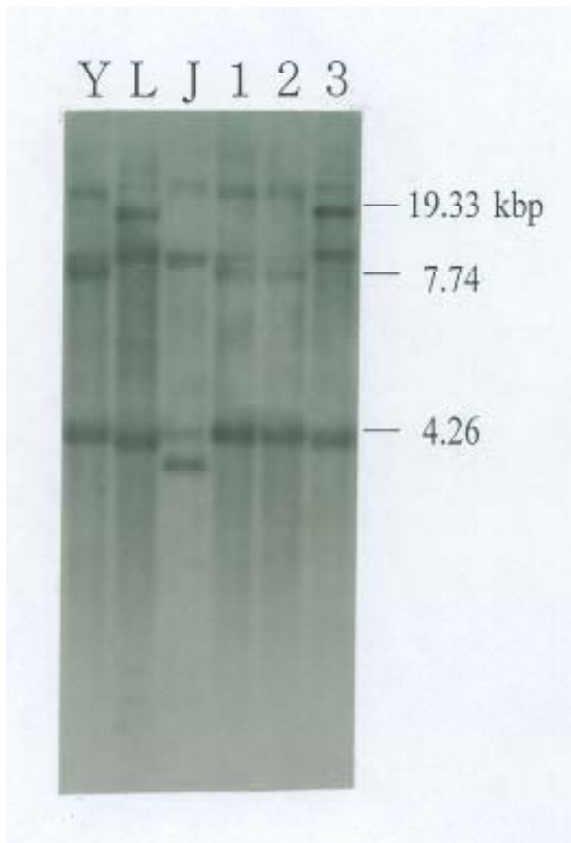


第 35 図 ウンシュウとユズとの細胞融合により得られた植物体と
両親との葉形質の比較
(左から: ウンシュウ, JY1, JY2, ユズ)



第 36 図 ウンシュウとレモンとの細胞融合により得られた植物体と
両親との葉形質の比較
(左から: ウンシュウ, JL1, レモン)

再分化個体の葉の形質は、それぞれ葉肉親とよく似ており（第 35, 36 図）、染色体数は $2n=18$ の二倍体であった。イネ rDNA をプローブに用いた Southern blot 解析では、再分化個体が葉肉親であるユズもしくはレモンと同じバンドパターンを示したが（第 37 図）、タバコの cpDNA をプローブに用いた場合は、全ての再分化個体がカルス親であるウンシュウと同じパターンを示した（第 38 図）。これらのことから、再分化個体はそれぞれユズもしくはレモンの核を持ち、ウンシュウの細胞質由来遺伝子を持つ細胞質雑種であると思われた。



第 37 図
ウンシュウとユズもしくはレモンとの細胞融合により得られた植物体のサザン解析 その 1

rDNA probe, Dra I digests

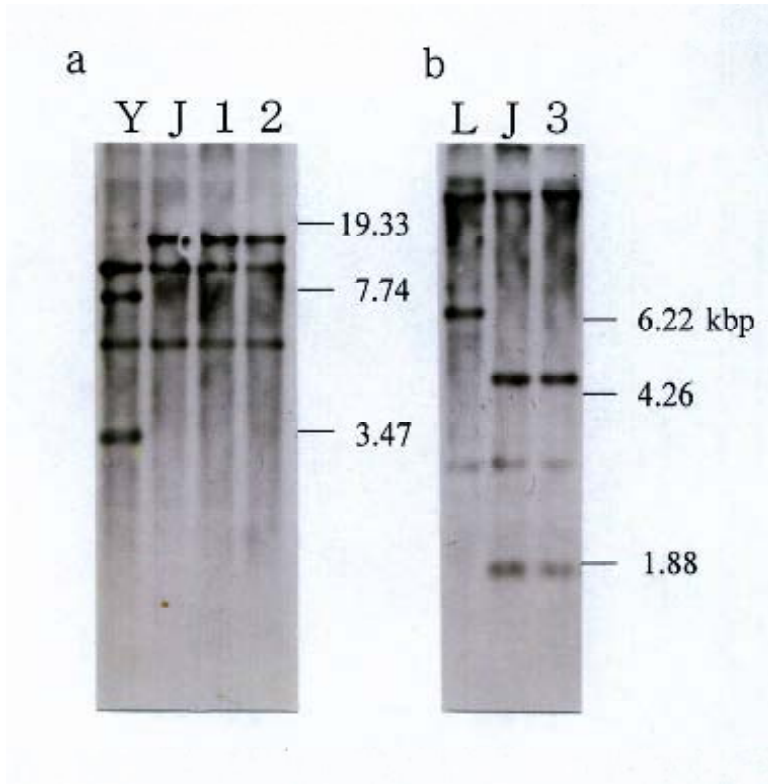
Y: ユズ

L: レモン

J: ウンシュウ

1: JY1, 2: JY2, 3: JL1

Moriguchi ら（1996）は、特定の cell line と融合組合せのどちらか、もしくはその両方によって、高い確率で細胞質雑種が得られることを報告している。本実験では、ウンシュウ（十万温州）とユズもしくはレモンとの組合せで細胞質雑種のみが得られた。しかし、Hidaka and Omura（1992）はウンシュウ（猿渡温州）とユズもしくはラフレモンとの電気融合により体細胞雑種のみを得ている。これらの結果は、属内の細胞融合における細胞質雑種の獲得は、特定の品種の組み合わせよりも cell line によるところが大きい事を示している。



第 38 図

ウンシュウとユズもしくは
レモンとの細胞融合により
得られた植物体の
サザン解析その 2

cpDNA probe

(a) Sac I

(b) Pst I digests

Y: ユズ

L: レモン

J: ウンシュウ

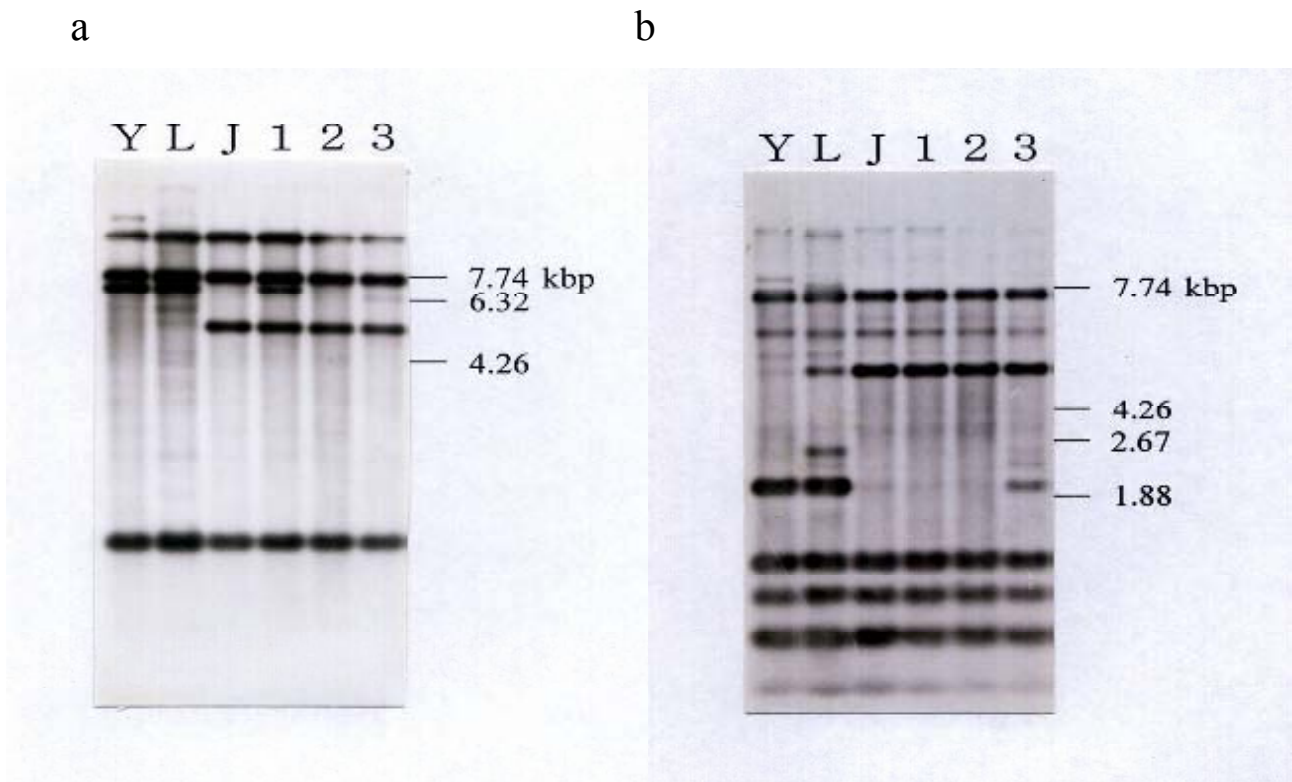
1: JY1, 2: JY2, 3: JL1

mtDNA 解析においては, *B. campestris* の mtDNA 断片の P4.8, P9.7, S8.3 および S11.8 をプローブに用いた. 制限酵素に *Hind* III, プローブに P4.8 もしくは P9.7 を用いた場合, 全ての細胞質雑種はウンシュウと同じバンドパターンを示した. しかし, 制限酵素に *Hind* III, プローブに S8.3 を用いた場合には, 全てがウンシュウと同じバンドパターンを示したが, JY1 はその上にユズ固有のバンドの一部を示した (第 39a 図). また, S11.8 をプローブに用いた場合, JY1 および JY2 はウンシュウと同じパターンを示したが, JL1 はウンシュウと同じバンドに加えてレモン固有のバンドの一部も示した (第 39b 図). これらの結果から, JY1 と JL1 はミトコンドリアゲノムの再編成が行われていた事が明らかになった.

Saito ら (1993) は, 彼らが得た体細胞雑種および細胞質雑種の全てがカルス親の mtDNA を持っていたことから, カンキツにおける再分化にはカルス親の mtDNA が重要な役割を担っているとしており, 多くの細胞融合においてもカルス親の mtDNA が欠かすこのできないものであることを示している. (Kobayashi, 1991, Motomura ら, 1995, Saito ら, 1994, Grosser ら, 1996, Moriguchi ら, 1996).

一方, mtDNA の再編成は属間での体細胞雑種 (Motomura ら, 1995) および属内での細胞質雑種 (Moriguchi ら, 1997) において確認されており, 本実験においてもミトコンドリアゲノムの再編成が確認された. しかし, これらの細胞融合由来植物体で, 葉肉親由来の mtDNA だけを持った再分化植物は存在しないばかりか, カルス親の mtDNA が欠損していると思われる個体もみられなかった. ゆえに, カルス親由来の mtDNA は細胞分裂および

植物体再生には重要な役割を担っていることは間違いないと思われた。



第 39 図 ウンシュウとユズもしくはレモンとの細胞融合により得られた植物体のサザン解析 その 3

(a) mtDNA S8.3 probe, Hind III digests (b) mtDNA S11.8 prebe, Hind III digests

(Y: ユズ, L: レモン, J: ウンシュウ, 1: JY1, 2: JY2, 3: JL1)

3. 体細胞雑種および細胞質雑種の種子形成能力とCTV抵抗性

スダチとユズの体細胞雑種 SY1 ~ SY9 のうち、SY1 と SY8 が開花した。観察による花粉量はスダチよりやや多く、ユズより少ない程度だった。花粉稔性はスダチが 56.0%、ユズが 86.9%であるのに対して、SY1 と SY8 はそれぞれ 70.2%および 73.9%であり、およそ両親の中間的な値を示した (第 5 表)。このことは、Kobayashi ら (1995) の体細胞雑種は正常な花粉稔性を示し、三倍体育成のための育種素材として可能であるという意見と一致する。ただ、SY1 および SY8 は結実したものの、共に途中で落果してしまい、果実を分析するには至らなかった。

また、ウンシュウは全く花粉を形成しないの対して、JY1 および JY2 はユズと同じ程度の花粉を生産した (第 40 図)。花粉稔性もそれぞれ 86.2%、85.9%であり、ほとんどユズと同じ花粉稔性を示した (第 5 表)。さらに、それぞれが結実し果実分析を行ったが、種子数は対照のユズとほとんど変わらなかった (第 41 図)。

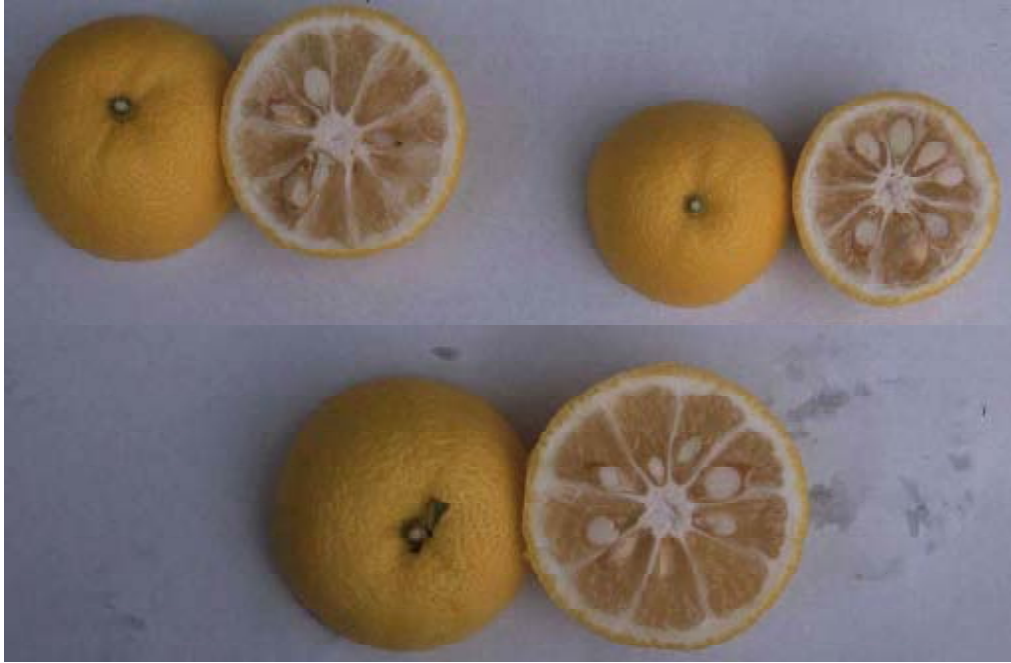
第 5 表 体細胞雑種および細胞質雑種の花粉稔性と SP 発生程度

系統名	rDNA	mtDNA	cpDNA	花粉稔性	SP発生程度
SY1	スダチ+ユズ	スダチ	スダチ	70.2	21.8
SY3	スダチ+ユズ	スダチ	ユズ	— ^z	15.3
SY8	スダチ+ユズ	スダチ	スダチ	73.9	21.5
JY1	ユズ	ウンシュウ+ユズの一部	ウンシュウ	86.2	29.4
JY2	ユズ	ウンシュウ	ウンシュウ	85.9	26.3
JL1	レモン	ウンシュウ+レモンの一部	ウンシュウ	—	4.2
本田系スダチ				56.0	3.3
新居系スダチ				20.6	—
ユズ (平の香)				86.9	20.9
ユーレカレモン				—	5.1

z : 未検定



第 40 図 JY1 の花と正常な柱頭および花粉



第 41 図 JY1 および JY2 の正常に種子形成された果実
(上段左から：JY1, JY2, 下段：平の香)

イネや大豆をはじめとする多くの高等植物において，細胞質雄性不稔とミトコンドリアゲノムは強く関係していると報告されている (Kadowaki ら，1986, Kemble ら，1980)．カンキツにおいても同様であると思われ，ウンシュウの細胞質にも雄性不稔遺伝子が存在すると言われている (Iwamasa, 1966; 山本ら，1992)．しかしながら，ウンシュウの細胞質を持つ JY1 および JY2 の種子形成能力がユズと変わらなかったことは，カンキツの雄性不稔性は細胞質遺伝子と核遺伝子との相互作用によって決定されるという Yamamoto ら (1995) の意見と一致し，ユズは細胞質雄性不稔遺伝子を阻害する核遺伝子を持っているか，もしくは稔性が優勢的に発現するような核遺伝子を持つと考えられる．

体細胞雑種および細胞質雑種への CTV 強毒系統を接種したところ，SY1～3, JY1, JY2 およびユズ，すなわちユズの核遺伝子を持つ全ての系統において強い SP の発生が見られた (第 5 表)．スダチ，レモンおよび JL1 の SP は軽度の発生であった．なお，本実験では調査していないが，一般的にウンシュウにはほとんど SP の発生が見られない (宮川，1971)．CTV に比較的強い抵抗性を示すスダチの核遺伝子を持っているにもかかわらず，ユズの核遺伝子を持つ個体に強い SP が観察されたこと，強い抵抗性を示すウンシュウの細胞質を持っているにもかかわらず SP の発生程度が変わらなかったことから，カンキツの CTV 抵抗性は核遺伝子により決定され，ユズは罹病性の核遺伝子を持ち，しかもその遺伝子が強く発現しており，CTV 抵抗性が単純な遺伝様式でないことは推察できる．吉田ら (1983) はカンキツ雑種における CTV 抵抗性の分離状況の調査において，SP 発生度の高い親ほど次代の SP 発生度が高いことを示しているが，遺伝様式まで明確にするに至っていないこ

とからも，CTV 抵抗性は複数の遺伝子が関与しており，1 対の単一遺伝子によるものでないことは明らかである．

今までにもいくらかの細胞質雑種が得られており，これらは細胞質の遺伝情報を明らかにする重要な実験材料になりうる．しかしながら，今までに細胞質雑種の病害虫抵抗性が報告された例はない．本研究によって，細胞質遺伝子が CTV 抵抗性に関与していない事実を明らかにしたが，さらに，かいよう病やヤノネカイガラムシ抵抗性をはじめ，様々な病害虫抵抗性を調査することによって，細胞質が関与する遺伝情報を明らかにすることが出来るだろう．

第 4 章 まとめ

三倍体の無核スダチ育成を目指し、1992 年から 1994 年の 3 年間に四倍体スダチと二倍体スダチとの間で 768 花の交配を行い、63 個体の三倍体を得た。三倍体の選抜にはフローサイトメーターを用いた。二倍体を種子親に用いた場合は不完全種子が形成され、三倍体はほとんど得ることが出来なかった。四倍体を種子親に用いた場合は完全種子が形成され、ある程度の三倍体を得ることができた。それらの中から‘徳島 3X1 号’を選抜し、種苗法に基づき品種登録した。‘徳島 3X1 号’の果肉は鮮やかな緑色で種子はなく、果汁は豊富である。さらに、今までのスダチで最も早く収穫することができ、高品質果実生産が可能な早生スダチとして期待されている。また、二倍体と四倍体との交配における副産物として、単胚性の雑種四倍体を得られた。今後これを育種母本とすることで、育種効率が飛躍的に向上することが期待される。今回の実験により、三倍体の作出は、スダチのみならず他の香酸カンキツにおいても無核品種を育成する最も有効な方法の一つであると思われた。

また、スダチとユズの体細胞雑種とウンシュウとユズおよびレモンとの細胞質雑種を作出した。体細胞雑種の mtDNA はカルス親のスダチと同じパターンを示し、cpDNA は分離した。一方、細胞質雑種の cpDNA はカルス親のウンシュウと同じパターンを示したが、一部で mtDNA の再編成が見られた。体細胞雑種および細胞質雑種の花粉稔性は正常であり、体細胞雑種は倍数性育種の交配母本になりうる事が判った。またカンキツの雄性不稔は核遺伝子と細胞質遺伝子との相互作用によって起こることを再確認した。CTV 抵抗性には細胞質遺伝子は関与しておらず、ユズの罹病性が強く発現した。今後、細胞質雑種および体細胞雑種の病虫害抵抗性を調査していくことで、細胞質が関与する遺伝を明らかにし、育種効率の向上に貢献できることが可能であると思われた。

謝辞

本論文は愛媛大学大学院連合農学研究科在学時の学位論文として取りまとめたものであり、恩師香川大学教授（愛媛大学大学院連合農学研究科教授）一井眞比古博士には終始御懇篤なるご指導を賜った。また香川大学助教授武田眞博士にも懇切なるご教示を賜った。ここに謹んで謝意を表する。

また研究実施と大学院への進学にあたり、元徳島県果樹研究所所長赤井昭雄氏、同じく元徳島県果樹研究所所長長谷部秀明博士および徳島県果樹研究所十河和男所長には適切なお助言とご配慮をいただいた。ここに心から感謝申し上げる。さらに本研究の礎を築いただけでなく、常に適切なお助言とご指導を賜った徳島県果樹研究所山尾正実次長、共に研究し多くの協力を戴いた徳島県果樹研究所新居美香研究員（現：徳島農業改良普及センター）に厚く御礼申し上げます。また、実験技術および実験結果の解析に関する多大なお指導とご助言を賜った独立行政法人果樹研究所ブドウ・カキ支場上席研究官小林省藏博士に厚く御礼申し上げます。さらに独立行政法人果樹研究所平林利郎上席研究官、同カンキツ部吉田俊雄室長および根角博之研究員（現：長崎県果樹試験場）に多大なお協力を戴き、同大村三男博士（現：静岡大学教授）にも適切なお助言を戴いた。

さらに、実験を遂行するにあたり、病虫害抵抗性について辻雅人専門研究員にご助言を戴き、河野由希研究員にはCTV抵抗性検定を実施して戴いた。また、‘徳島3X1号’の栽培試験に関して柴田好文専門研究員、津村哲宏主任研究員、安宅秀樹研究員からも多大なお協力とご援助を戴いた。また、第1章の在来スタチ系統の写真は津村哲宏主任研究員に、在来ユズ系統の写真は元徳島県果樹研究所音井格氏に原図をご提供頂いた。記して深く感謝の意を表する。

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. 1948. Genetics and breeding. p. 817-885. In: H. J. Webber and L. D. Bachelor (eds.) *The Citrus Industry*, vol. I, University of California Press, Berkeley and Los Angeles.
- Grosser, J. W., F. G. Gmitter and J. L. Chandler. 1988. Intergeneric somatic hybrid plants of *Citrus sinensis* cv. Hamlin and *Poncirus trifoliata* cv. Flying Dragon. *Plant Cell Rep.* 7: 5 – 8.
- Grosser, J. W., F. G. Gmitter N. Tusa and J. L. Chandler. 1990. Somatic hybrid plants from sexually incompatible woody species: *Citrus reticulata* and *Citropsis Gletiana*. *Plant Cell Rep.* 8: 656 – 659.
- Grosser, J. W., F. G. Gmitter, Jr., N. Tusa, G. Reforgiato Recuperio and P. Cucinotta., 1996. Further evidence of a cybridization requirement for plant regeneration from citrus leaf protoplasts following somatic fusion. *Plant Cell Rept* 15: 672 – 676.
- Hearne, C. J. 1984. Development of seedless orange and grapefruit cultivars through seed irradiation. *J. Amer. Soc. 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.
- Hidaka, T. and M. Omura., 1992. Regeneration of somatic hybrid plants obtained by electrical fusion between satsuma mandarin (*Citrus unshiu*) and rough lemon (*C. jambhiri*) or yuzu (*C. junos*). *Japan. J. Breed* 42: 79 – 89.
- Iwamasa, M., 1966. Studies on the sterility in genus citrus with special reference to the seedlessness. *Bull. Hort. Res. Stn. Japan* B6: 1 – 18.
- Kadowaki, K., T. Ishige, S. Suzuki, K. Harada and C. Shinjo., 1986. Differences in the characteristics of mitochondrial DNA between normal and male sterile cytoplasms of japonica rice. *Japan. J. Breed* 36: 333 – 339.
- 金好純子・加納徹治・桑田祐二・平尾 晃・中谷宗一・小林省藏・1997. 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. *園学雑*66: 9–14.
- 片岡郁雄・日高啓・井上宏. 1991. 甘果オウトウ (*Prunus avium* L.) とユウゴクオウトウ (*P. pauciflora* Bunge) の種間雑種. *香川大学農学部学術報告* 43: 11 – 21.
- Kaul, M. L. H., 1988. In “Male sterility in higher plants”, p. 97-192, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Kemble, R. J., R. E. Gunn and R. B. Flavell., 1980. Classification of normal and male-sterile cytoplasms in

- maize. II. Electrophoretic analysis of DNA species in mitochondria. *Genetics* 95: 451 – 458.
- Kobayashi, S., T. Ohgawara, K. Fujiwara and I. Oiyama., 1991. Analysis of cytoplasmic genomes in somatic hybrids between navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) and ‘Murcott’ tangor. *Theor. Appl. Genet* 82: 6 – 10.
- Kobayashi, S., T. Ohgawara, E. Ohgawara, I. Oiyama and S. Ishii. 1988. A somatic hybrid plant obtained by protoplast fusion between navel orange (*Citrus sinensis*) and satsuma mandarin (*C. unshiu*). *Plant Cell Tissue Organ Culture* 14: 63 – 69.
- Kobayashi, S., T. Ohgawara, W. Saito, Y. Nakamura and J. Shimizu. 1995. Fruit characteristics and pollen fertility of citrus somatic hybrids. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 64: 283 – 289.
- Kobayashi, S., T. Ohgawara, W. Saito, Y. Nakamura and M. Omura. 1997. Production of triploid somatic hybrids in *Citrus*. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 66: 453 – 458.
- 小池明. 1988. スダチの胚培養による交雑実生の獲得について. 徳島果試研報 16: 1 – 8.
- Lapin, W. K. 1937. Investigation of polyploidy in citrus. U. S. S. R. All-Union Sci. Res. Inst. Humid Subtropics Works. 1: 1 – 68.
- Leaver, C. J. and M. W. Gray., 1982. Mitochondrial genome organization and expression in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol* 33: 373 – 402.
- Longley, A. E. 1926. Triploid citrus. *Washington Acad. Sci.* 16: 543 – 545.
- 松本亮司・奥代直巳. 1990. カンキツかいよう病抵抗性の遺伝. 園学雑 59: 9 – 14.
- Miranda, M., T. Motomura, F. Ikeda, T. Ohgawara, W. Saito, T. Endo, M. Omura and T. Moriguchi. 1997. Somatic hybrids obtained by fusion between *Poncirus trifoliata* (2X) and *Fortunella hindsii* (4X) protoplasts. *Plant Cell Rept* 16: 397 – 400.
- 宮川経邦. 1971. ハッサク萎縮病罹病樹に保毒される tristeza (stem pitting) virus に対するカンキツ品種の反応. 徳島果試研報 4: 1 – 15.
- Mookdasanit, J., H. Tamura, T. Yoshizawa, T. Tokunaga and K. Nakanishi. 2003. Trace volatile components in essential oil of *Citrus sudachi* by means of modified solvent extraction method. *Food Sci. Technol. Res.* 9: 54 – 61.
- Moriguchi, T., T. Motomura, T. Hidaka, T. Akihama and M. Omura., 1996. Genotype and parental combination influence efficiency of cybrid induction in *Citrus* by electrofusion. *HortScience* 31 (2): 275 – 278.
- Moriguchi, T., T. Motomura, T. Hidaka, T. Akihama and M. Omura., 1997. Analysis of mitochondrial genomes among *Citrus* plants produced by the interspecific somatic fusion of ‘Seminole’ tangelo with rough lemon. *Plant Cell Rept* 16: 397 – 400.
- Motomura, T., T. Hidaka, T. Moriguchi, T. Akihama and M. Omura., 1995. Intergeneric somatic hybrids between *Citrus* and *Atalantia* or *Severinia* by electrofusion, and recombination of mitochondrial genomes. *Breed. Sci* 45: 309 – 314.
- Motomura, T., T. Moriguchi, T. Akihama, T. Hidaka and M. Omura. 1996. Analysis of cytoplasmic genomes

- in somatic hybrids between ‘Hazara (Abohar)’ (*Cirus reticulata* Blanco) and *Microcitrus australis* (Planch.) Swingle. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 65: 497 – 503.
- Murashige, T. and F. Skoog., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473 – 497.
- 西浦昌男・上野 勇. 1973. カンキツ品種のヤノネカイガラムシ抵抗性とその遺伝. 木本作物の育種 (別刷) 農林省林業試験場.
- 西浦昌男・七條寅之助・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* B10: 1 – 9.
- Ohgawara, T., S. Kobayashi, E. Ohgawara, H. Uchiyama and S. Ishii. 1985. Somatic hybrid plants obtained by protoplast fusion between *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. *Theor. Appl. Genet.* 71: 1 – 4.
- Ohgawara, T., S. Kobayashi, S. Ishii, K. Yoshinaga and I. Oiyama. 1989. Somatic hybridization in Citrus: Navel orange (*Citrus sinensis*. Osb) and grapefruit (*C. paradisi* Macf.). *Theor. Appl. Genet.* 78: 609 – 612.
- Ohgawara, T., H. Uchiyama, S. Ishii and S. Kobayashi. 1994. Somatic hybridization between *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 27: 339 – 454.
- 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* D3: 1 – 7.
- 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.
- 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.
- Padrayuttawat, A., T. Yoshizawa, H. Tamura and T. Tokunaga. 1997. Optical isomers and odor thresholds of volatile constituents in *Citrus sudachi*. *Food Sci. Technol. Int. Tokyo.* 3: 402 – 408.
- Palmer, J. D. and C. R. Shields., 1984. Tripartite structure of the *Brassica campestris* mitochondrial genome. *Nature* 307: 437 – 440.
- Rogers, S. O. and A. J. Bendich., 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium, and mummified plant tissues. *Plant Mol. Biol.* 5: 69 – 76.
- Saito, W., T. Ohgawara, J. Shimizu, S. Ishii and S. Kobayashi., 1993. *Citrus* cybrid regeneration following cell fusion between nucellar cells and mesophyll cells. *Plant Sci* 88: 195 – 201.
- Saito, W., T. Ohgawara, J. Shimizu and S. Kobayashi., 1994. Somatic hybridization in *Citrus* using embryogenic cybrid callus. *Plant Sci* 99: 89 – 95.
- Shinozaki, S., K. Fujita, T. Hidaka and M. Omura. 1992. Plant formation of somatic hybrids of sweet orange (*Citrus sinensis*) and its wild relative, orange jessamin (*Murraya paniculata*), by electrically-induced protoplast fusion. *Japan. J. Breed.* 42: 287 – 295.
- Soost, R. K. and J. W. Cameron. 1980. ‘Oroblanco’, a triploid pomelo-grapefruit hybrid. *HortScience* 15: 667 – 669.

- Soost, R. K. and J. W. Cameron. 1985. 'Melogold', a triploid pomelo-grapefruit hybrid. HortScience 20: 1134 – 1135.
- Southern, E. M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol 98: 503 – 517.
- Sugiura, M., K. Shinozaki, N. Zaita, M. Kusuda and M. Kumano., 1986. Clone bank of the tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplast genomes as a set of overlapping restriction endonuclease fragments: mapping of 11 ribosomal protein genes. Plant Sci 44: 211 – 216.
- Starrantino, A. and G. R. Recupero. 1981. Citrus hybrids obtained from 2X female × 4X males. Proc. Intl. Soc. Citricult. 1: 31 – 32.
- Takaiwa, F., K. Oono and M. Sugiura., 1984. The complete nucleotide sequence of a rice 17s rRNA gene. Nucleic Acids Res 12: 5441 – 5448.
- Takayanagi, R., T. Hidaka and M. Omura. 1992. Regeneration of intergeneric somatic hybrids by electrical fusion between Citrus and its wild relatives: mexican lime (*Citrus aurantifolia*) and java feroniella (*Feroniella lucida*) or tabog (*Swinglea glutinosa*). J. Japan. Soc. Hort. Sci. 60: 799 – 804.
- 立川忠夫・田中輪一郎・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.
- 竹中美香・徳永忠士・平林利郎・赤井昭雄. 1997. フローサイトメーターを用いた 3 倍体香酸カンキツの簡易選抜. 徳島果試研報 25: 17 – 20.
- Tamura, H., A. Padrayuttawat and T. Tokunaga. 1999. Seasonal change of volatile compounds of *Citrus sudachi* during maturation. Food Sci. Technol. Res. 5 (2): 156 – 160.
- Vardi, A., A. Breiman and E. Galun., 1987. *Citrus* cybrids: production by donor-recipient protoplast-fusion and verification by mitochondrial-DNA restriction profiles. Theor. Appl. Genet 75: 51 – 58.
- Vardi, A., P. Arzee-Gonen, A. Frydman-Shani, S. Bleichman and E. Galun. 1989. Protoplast-fusion-mediated transfer of organelles from Microcitrus into Citrus and regeneration of novel alloplasmic trees. Theor. Appl. Genet. 78: 741 – 747.
- Whitfeld, P. R. and W. Bottomley., 1983. Organization and structure of chloroplast genes. Annu. Rev. Plant Physiol., 34: 279 – 310.
- 山尾正実・小池明・音井格・徳永忠士・定作昭. 1993. スダチ 4 倍体果実の特性と胚培養. 徳島果試研報 21: 14 – 22.
- 山本雅史・奥代直巳・松本亮司. 1992. アンコール (*Citrus nobilis* × *C. deliciosa*) を種子親に用いた交雑実生におけるやくの退化の分離. 園学雑 60: 785 – 789.
- Yamamoto, M., R. Matsumoto and Y. Yamada., 1995. Relationship between sterility and seedlessness in citrus. J. Japan. Soc. Hort. Sci 64: 23 – 29.
- Yamamoto, M. and S. Kobayashi., 1995. A cybrid plant produced by electrofusion between *Citrus unshiu* (*satsuma mandarin*) and *C. sinensis* (*sweet orange*). Plant Tissue Cult. Lett., 12: 131 – 137.
- 吉田俊雄・七條寅之助・上野勇・木原武士・山田彬雄・平井正志・山田峻一・家城洋之.

1983. カンキツトリステザウィルス抵抗性品種の検索及び雑種における抵抗性の分離状況. 果樹試報 B 10: 51 - 68.

吉田俊雄・根角博久・吉岡照高・家城洋之・伊藤祐司・中野睦子. 2000. キンカン新品種‘ぷちまる’の育成. 園学雑69(別1) : 226.

吉田俊雄. 2003. 高品質・単胚性カンキツ品種「清見」の育成. 育種学研究 5: 103 - 107.