

## 近畿大学カンキツ類系統保存品種花粉の発芽

仁藤 伸昌<sup>1</sup>, 松川 哲也<sup>1</sup>, 伊東 卓爾<sup>1</sup>, 我藤 雄<sup>2</sup>

## 要旨

近畿大学附属農場湯浅農場のカンキツ類系統保存園に維持されているカンキツの 44 品種・系統を用い花粉の発芽率の調査を行った。花粉をショ糖 10% 添加の 1% 寒天培地上に置床し、6 時間培養した。花粉採取直後の発芽率は品種系統により 65.2% (イーチャンレモン) から 3.0% (ラスクシトレンジ) までの差が見られた。シリカゲルを乾燥剤とした乾燥および 5℃ の貯蔵では、花粉採取後 2 カ月で花粉発芽率は低下し、5 カ月を超えると多くの品種・系統の花粉からは発芽が見られなかった。Tanaka による系統分類と花粉発芽との間には相関は見られなかった。本研究の結果は、近畿大学におけるカンキツ類遺伝資源保存の発展に寄与するものと思われる。

## 1. 結論

カンキツ類は、ミカン亜科植物のうちカラタチ属 (*Poncirus*)、カンキツ属 (*Citrus*) およびキンカン属 (*Fortunella*) に含まれる植物種をさす。カラタチ属植物は 1 属 1 種のカラタチ (*Poncirus trifoliata*) のみであり、果実は生食には不適であり、漢方薬として利用されるか、カンキツ栽培における台木として用いられている。キンカン属の植物種の一部は生食あるいは加工品として消費され、また他の種は、観賞用植物として利用されている。

世界各国で広く栽培され、利用されているのはカンキツ属である。カンキツ属植物種は多数あるが、系統分類に関しては確たるものはない。カンキツ類の系統分類が明確にできない理由は、カンキツ類植物の性的独立性の低さにある。すなわち、カンキツ類 3 属間での交配が可能であったり、またカンキツ属内においても容易に交雑種が発生したりする。人為的な交配のみならず自然交雑による交雑種の発生が見られる。カンキツ類は、交雑の容易さに加え、突然変異の発生も多く、突然変異種が栽培品種として広く用いられることもある。

カンキツ属の系統分類に関し、多くの提案が行われてきたが、主たるものは Swingle<sup>(6)</sup> と Tanaka<sup>(7)</sup> によるものである。両者の分類に対する見解の相違は、Swingle が野生種および自然発生した種を重視して分類を試みたことに対し、Tanaka は、種とは他と明らかに区別できる特徴を持ったものであるとして、栽培の過程で発生した品種・系統も種として扱ったことにある。Swingle は、カンキツ属を 16 種に分類し、Tanaka は、162 種に分類した。Tanaka は、種の発生の地理的分布を重視し、その分類においてわが国で発生したと思われる種をあげている。本研究では、二者の系統分類の優劣を議論するものではなく、わが国在来種及び品種・系統の分類を議論する上においては、Tanaka の分類が現実的であると判断した。

現在、生物遺伝資源の保存と管理は国家的政策として重要視され、カンキツ類もその一部として認識されている<sup>(4)</sup>。近畿大学附属農場湯浅農場では 1972 年以来カンキツ類の品種・系統の収集と保存を行い、2007 年 3 月現在、200 を超える品種・系統を維持し、さらに拡充を図っている。これらの材料を用い、著者らはわが国在来種の発祥、発祥の基になった品種・系統の検証などの研究を推進している。本研究は花器に関する研究のうち花粉の貯蔵に関する基礎的知見を得るために行ったものである。

---

原稿受付 2008 年 6 月 20 日

本研究は近畿大学生物理工学部戦略的研究 No.05-III-1, 2006 の助成を受けた。

1. 近畿大学生物理工学部 生物工学科, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

2. 近畿大学附属農場湯浅農場 〒643-0004 和歌山県有田郡湯浅町湯浅 2355-2

Table 1. Citrus materials and the rate of pollen germination. Germination rate of 110 pollen grains were observed with 5 replicants (% $\pm$ SE). Botanical names are given according to Tanaka's system<sup>(7)</sup>

Japanese name	English name	Botanical name
スイートライム	Sweet Lime	<i>C. limettioides</i> Tan.
ブンタン (安政柑)	Anseikan	<i>C. grandis</i> Osb.
ブンタン (水晶文旦)	Suishou-buntan	<i>C. grandis</i> (L.) Osb.
ブンタン (平戸文旦)	Hirado-buntan	<i>C. grandis</i> (L.) Osb.
キヌカワ	Kinukawa	<i>C. glaberrima</i> Hort. ex Tan.
アサヒカン	Asahikan	<i>C. asahikan</i> Hort. ex Tan.
コトウカン	Kotokan	<i>C. kotokan</i> Hayata
ハッサク	Hassaku	<i>C. hassaku</i> Hort. ex Tan.
イワイカン	Iwaikan	<i>C. iwaikan</i> Hort. ex Y. Tanaka
ナルト	Narutokan	<i>C. medioglobosa</i> Hort. ex Tan.
オオタチバナ (寿柑)	Kotobukikan	<i>C. otachbana</i> Hort. Y. Tanaka
ヒョウカン	Hyoukan	<i>C. ampullacea</i> Hort. ex Tan.
サンボウカン	Sanboukan	<i>C. sulcata</i> Hort. ex Takahashi
キクダイダイ	Kikudaikai	<i>C. canaliculata</i> Hort. ex Y. Tan.
タンカン (高しょう系)	Koushou-Tankan	<i>C. tankan</i> Hayata
タンカン (低しょう系)	Teishou-Tanakan	<i>C. tankan</i> Hayata
イヨカン	Iyo-kan	<i>C. iyo</i> Hort. ex Tan.
ヒュウガナツ	Hyuganatsu	<i>C. tamurana</i> Hort. ex Tan.
カワバタ	Kawabata	<i>C. aurea</i> Hort. ex Tan.
ハナユ	Hanayu	<i>C. hanaju</i> Sieb. ex Shirai
スダチ	Sudachi	<i>C. sudachi</i> Hort. ex Shirai
ユコウ	Yukou	<i>C. yuko</i> Hort. ex Tan.
イーチャンレモン	Ichan Lemon	<i>C. wilsonii</i> Tan.
カボス	Kabosu	<i>C. sphaerocarp</i> Hort. ex Tan.
クネンボ	Kunenbo	<i>C. nobilis</i> Lour.
ヤツシロ	Yatsushiro	<i>C. yatsushiro</i> Hort. ex Tan.
ケラジ	Keraji	<i>C. keraji</i> Hort. ex Tan.
ポンカン (中野3号)	Ponkan (Nakano No 3)	<i>C. reticulata</i> Blanco
ポンカン (低しょう系)	Ponkan (depressed form)	<i>C. reticulata</i> Blanco
タチバナ	Tachibana	<i>C. tachibana</i> (Mak.) Tan.
コベニミカン	Kobenimikan	<i>C. erythrosa</i> Hort. ex Tan.
コウジ	Kouji	<i>C. leiocarpa</i> Hort. ex Tan.
シキキツ	Shikikitsu	<i>C. madurensis</i> Lour.
ジャバラ	Jabara	<i>C. jabara</i> Hort. ex Tan.
安藤柑	Andokan	Not identified
黄金柑	Ogonkan	Not identified
帯高蜜柑	Obitakamikan	Not identified
唐蜜柑	Karamikan	Not identified
菊蜜柑	Kikumikan	Not identified
小林柑	Kobayashikan	Not identified
支那蜜柑	Shinamikan	Not identified
早柚	Yayayu	Not identified
ラスクシトレンジ	Rusk Citrange	<i>Poncirus</i> X <i>C. sinensis</i>
トーマスビルシトレンジカット	Thomasville Citrangequat	<i>Fortunella</i> sp. X Citrange

Table 1. (Continued)

Dates of culture and observation for pollen germination						
May 30	July 1	July 27	Aug. 27	Sept. 28	Oct. 30	Nov. 30
30.4±0.51	32.6±1.29	16.2±1.59	22.4±1.81	11.8±1.91	11.6±1.47	0.4±0.40
24.4±1.08	3.6±0.51	9.2±0.97	0.2±0.20	0.2±0.20	4.4±0.98	0
7.8±0.86	2.6±0.60	2.8±0.58	0.2±0.20	0.2±0.20	0	0
61.0±2.77	22.0±1.27	48.6±1.66	3.4±0.51	16.0±1.64	5.8±1.07	3.4±0.60
12.2±1.39	12.4±1.66	1.8±0.20	5.4±0.68	2.8±0.66	0	0
6.0±1.10	6.2±0.73	1.0±0.32	2.8±1.71	0.8±0.38	0	0
9.8±1.59	9.2±0.97	6.6±1.08	4.2±0.92	8.0±0.63	0.6±0.40	1.0±0.63
14.8±1.93	16.2±1.56	2.4±0.60	1.8±0.38	4.6±0.51	0	0
28.8±2.58	27.2±1.11	13.4±0.81	2.2±0.58	23.0±2.61	5.6±0.75	0
2.6±0.40	1.0±0.55	1.4±0.25	2.0±0.45	0	0.2±0.20	0
3.2±0.73	5.0±0.63	2.0±0.45	0.4±0.25	1.2±0.38	0	0
11.8±1.07	13.4±0.93	11.4±1.03	6.0±0.71	13.8±1.46	0.6±0.25	0
11.2±1.43	2.8±0.66	3.2±0.20	5.6±0.51	1.6±0.51	0.4±0.25	0
25.0±2.00	16.4±0.25	15.2±1.32	14.6±2.18	9.2±1.32	0.4±0.25	0
14.4±1.50	20.0±0.71	5.2±0.97	3.0±0.45	6.2±0.73	3.4±0.51	0.2±0.20
21.6±1.69	17.2±1.36	6.8±1.74	9.6±0.75	6.8±0.73	3.0±0.32	1.4±0.60
9.8±1.46	4.4±0.51	4.2±0.39	1.2±0.58	1.4±0.25	0	0
39.2±1.62	29.0±1.48	24.0±2.30	26.4±2.04	27.2±1.88	12±0.45	4.8±0.86
34.0±1.70	17.8±0.66	12.0±1.64	0.8±0.20	12.0±0.55	0	0
36.0±1.14	46.8±1.24	38.2±3.37	10.6±1.63	8.3±0.86	5.4±0.81	5.8±1.02
11.6±1.08	8.4±0.51	3.4±0.51	1.8±0.38	2.8±0.38	0	0
14.0±1.31	11.4±0.25	4.6±1.03	7.8±0.97	9.8±1.07	1.0±0.32	0
65.2±1.02	41.6±1.29	28.2±4.16	6.2±0.73	35.8±1.65	2.6±0.68	0.6±0.40
25.4±1.44	12.4±1.81	4.0±0.45	4.6±0.40	1.6±0.68	0	0
17.6±1.86	24.0±2.08	13.0±1.31	13.0±1.48	19.4±1.69	5.6±0.51	0
4.6±0.68	1.8±0.38	0.6±0.25	0.2±0.20	0.2±0.20	0.4±0.25	0
35.2±1.93	21.2±1.24	9.6±2.20	13.6±1.50	5.6±0.75	4.0±0.45	0
25.2±1.93	33.2±0.97	26.2±1.62	2.2±0.38	15.6±0.81	4.8±0.68	3.0±0.71
23.6±1.03	19.8±1.24	13.2±0.88	7.6±1.33	11.8±0.58	6.6±0.98	0
37.0±2.37	32.0±0.71	24.4±2.80	20.2±1.62	22.2±1.32	7.6±1.21	0.6±0.40
38.0±1.23	28.4±1.78	25.8±0.86	18.2±1.59	13.6±0.87	17.4±0.75	7.2±0.66
16.8±0.49	17.6±0.87	4.4±0.51	7.4±0.75	13.2±0.86	1.8±0.38	1.4±0.51
5.4±0.60	6.0±0.55	5.2±0.38	3.8±0.80	3.8±0.49	0.2±0.20	0
12.0±1.41	24.6±1.89	10.0±1.10	8.6±1.78	13.0±1.00	1.0±0.32	0
16.2±1.74	13.0±2.03	4.4±0.75	2.0±0.55	4.8±1.16	0	0
11.8±0.97	4.6±0.40	3.6±0.06	1.6±0.51	0.2±0.20	0	0
7.0±0.63	12.4±1.12	6.0±1.48	4.0±0.32	1.0±0.55	1.6±0.68	0
17.8±1.02	12.0±0.71	5.0±0.89	4.0±1.00	6.0±0.71	1.6±0.51	0
17.6±1.75	22.0±2.37	0.2±0.20	2.4±0.68	0.6±0.40	0.6±0.25	0
16.6±0.68	6.0±0.55	9.6±1.63	12.8±1.24	10.8±1.07	3.4±0.68	0
24.8±1.77	26.2±1.16	18.4±1.08	3.8±1.07	13.0±0.84	13.6±0.68	3.4±0.75
29.0±1.58	16.0±0.89	7.8±0.97	4.4±0.93	9.8±0.92	0	0
3.0±0.32	4.2±0.49	3.4±0.60	1.4±0.51	0.6±0.25	0	0
16.4±1.21	17.4±1.86	3.8±0.73	1.4±0.51	4.0±0.95	2.8±0.38	0.8±0.20

## 2. 材料および方法

Table 1 に示すカンキツ類 44 系統の花粉は、近畿大学附属農場湯浅農場の系統保存園から採取した。Table 1 の記載方法については「結果および考察」で記述した。

ウンシュウミカンやオレンジでは花粉が形成されない品種・系統がある。また、カラタチは、4 月末に開花し、キンカンの品種は 7 月の開花となる。開花期間には 1 カ月以上の差があるので、本研究では、2006 年 5 月 10 日から 5 月 20 日にかけて開花に至った品種・系統から順次採取を行った。他の品種の花粉の混合を防ぐために、花卉が反転していない状態の花で、採取当日に確実に開花するであろうことが予測できる開花直前の花を採取した。

花は蒸れるのを防ぐために紙袋に採取し、実験室に持ち帰った。花卉を取り除き、葯を葉包紙上に摘出し、室温で 20 時間乾燥させ、開葯と花粉の放出を促した。花粉を葉包紙で包み、シリカゲル入りの 1 L のデシケーターに入れ、5℃の冷蔵庫中で保存した。

供試できる花粉の準備が終了したのが 5 月 22 日であったので花粉の発芽試験は 5 月 30 日を第 1 回とし、約 30 日間隔で 7 月 1 日、7 月 27 日、8 月 27 日、9 月 28 日、10 月 30 日および 11 月 30 日の計 7 回行った。

発芽床にはショ糖 10% (w/v) を含む寒天 1% (w/v) の固形培地を用いた。溶解した培地をスライドガラス上に約 2mm の厚さに広げ、固化させた。

花粉を培地上に置床し、ろ紙で湿室とした暗黒の容器に入れ、28℃条件下で 6 時間培養した。予備実験において、培養時間と発芽率を検討したところ、花粉からの発芽は培養 2 時間後に始まり、6 時間以後の発芽率の上昇は余り見られず、ほぼ一定になった。培養時間を延長すると、発芽した花粉管が長くなって絡み合い、発芽率の調査に支障が出ることを確認した。

6 時間の培養後に発芽床に、乳酸、フェノール、グリセリンおよび水を 1:1:1:1 (v/v/v/v) 混合した溶液を溶媒とする 1% コットンブルー液を滴下し、花粉の固定と染色を行った。顕微鏡下で発芽床上の異なった場所 5 視野を観察し、1 視野ごとに 110 以上の花粉粒の発芽状況を調査し、発芽の平均値を計算した。10 視野の調査も行ったが、5 視野間に統計的有意差はなかったので 5 視野の平均とした。

## 3. 結果および考察

本研究で用いたカンキツ類の品種・系統は近畿大学附属農場湯浅農場で保存されているものである。保存のための列植図には導入時の品種・系統名が漢字、カタカナあるいはひらがなで記されている。これらの品種・系統名には、特定の地域で栽培されている地方名、同名異種、異種同名などが混在している可能性もある。すなわちすべての品種・系統に対応する学名を明らかにすることは困難であった。

カンキツ類の系統分類において、Swingle<sup>(6)</sup> は 16 種を、また Tanaka<sup>(7)</sup> は 162 種を提案している。本研究において用いた材料は、日本在来の品種・系統が多いことに鑑み、Tanaka の分類を採用することとした。Tanaka の分類に記載されている種に対し黒上<sup>(3)</sup> は漢字で、岩政<sup>(2)</sup> はカタカナで、池田<sup>(1)</sup> は漢字とカタカナで記している。これらの文献を基に表中の種名はカタカナで表記し、( ) 内に品種・系統名を付した。

また、表中の下部の安藤柑から早柚までの 8 系統はそれらが属すると思われる種名が Tanaka の分類では明確ではなかったので Not identified とした。これらのいずれの系統は、地方品種あるいは特産の品種としてごく僅かではあるものの栽培や、販売の記録を散見することができるので、実在の品種・系統として扱うこととした。

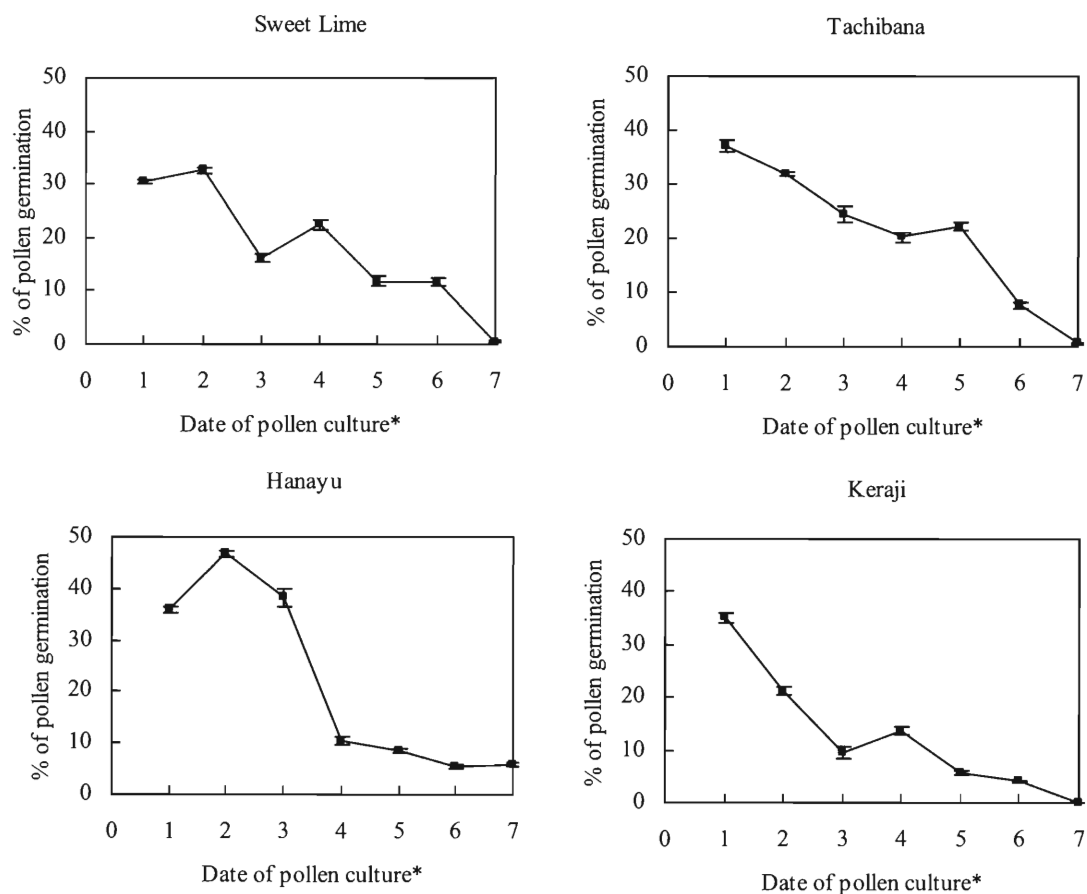
本実験に先立ち本学系統保存園のカンキツ品種・系統の花弁の長さ、走査型電子顕微鏡観察による花粉粒の直径、アセトカーミンによる花粉稔性を調査した<sup>(5)</sup>。花弁長は、コベニミカンの 9.7 mm からアンセイカンの 25.2 mm まで大きな変異が見られた。しかし、花粉粒の直径は、コベニミカンの 28.4 μm からヤツシロの 39.2 μm と変異は少なかった。花弁長と花粉粒の直径との相関は  $r^2=0.279$  と低かった。

アセトカーミンによる花粉稔性は、花粉採取が可能な品種においては、75%を超える高い値であった。花粉の稔性と発芽率との間には相関がないことは広く知られており、本実験でもそのことが裏付けられた。

本研究において花粉の採集開始日から最終日までに約10日間の差があり、厳密には5月30日の第1回目の調査までは時間が経過している。その後貯蔵条件を一定とし、約1ヶ月間隔で花粉の発芽試験を行ったので表中にはその日を記した。

花粉の発芽試験の結果は、Table 1 に示したように、品種・系統により変異が見られた。系統分類上の位置づけと花粉の発芽率及び貯蔵に対する発芽率の維持との間には一定の傾向は見られなかった。

5月30日の調査では、平戸ブントランが61.0%、スートライム、ヒュウガナツ、カワバタ、ハナユ、イーチャンレモン、ケラジ、タチバナおよびコベニミカンで30%以上であった。逆に、水晶ブントラン、コウトウカン、アサヒカン、ナルト、オオタチバナ（寿柑）、イヨカン、ヤツシロ、シキキツおよび帯高蜜柑では10%以下であった。いずれの品種においても花粉採取2カ月後の7月1日および7月27日までは発芽能力を有し、それ以後減少する傾向が見られた。花粉採取後5カ月を経た10月30日以降は多くの品種で0%となった。貯蔵6ヶ月を経た11月30日まで発芽能力を維持できたのは、スートライム、平戸ブントラン、タンカン、ヒュウガナツハナユ、イーチャンレモン、ポンカン、タチバナ、コベニミカン、コウジ、および支那蜜柑であったがその発芽率は低かった。



\* 1: May 30, 2: July 1, 3: July 27, 4: Aug 27, 5: Sept. 28, 6: Oct. 30, 7: Nov. 30

Fig. 1. Rate of pollen germination.

The rate of pollen germination of Keraji and Sweet Lime decreased gradually according to the duration of storage. The germination rate of Hanayu maintained 30% until July 27 and then decreased rapidly. The pollen grains of Tachibana showed high germination rate by September 27 and then decreased. Vertical bars show SD, n=5.

発芽率の減少のパターンに特徴が見られる品種・系統があった。ケラジとスイートライムは時間の経過と共に減少した (Fig. 1)。ハナユは、7月27日までは30%を超える発芽率であったが、その後急激に減少した。タチバナは、9月28日までの減少は少なく、その後減少し、11月30日には発芽率は0%となった。

将来のカンキツ育種においてわが国在来種の利用の可能性も検討すべきであり、花粉の貯蔵性の調査は重要である。低温貯蔵や有機溶媒中での保存などさらに研究を進めることが必要である。

#### 参考文献

- (1) 池田富喜夫 (2007) 田中式カンキツ分類学の再録. カンキツ研究 (Studia Citrologica) 17:113-120.
- (2) 岩政正男 (1999) カンキツ類とカンキツ近縁植物. 岩堀修一・門屋一臣編. カンキツ総論. p.79-113. 養賢堂.
- (3) 黒上泰治 (1960) 柑橘類. 黒上泰治著. 果樹園芸各論下巻. p.1-94. 養賢堂.
- (4) 仁藤伸昌, 片山幸良 (2000) カンキツ類の系統保存. 中辻憲夫編, ライフサイエンスのための系統保存とデータベース. p.68-73. 共立出版.
- (5) Nito, N., T. Matsukawa and T. Ito (2008) Germplasm Conservation of Indigenous Citrus. Acta Hort. 760: 105-108.
- (6) Swingle, W. T. (1967) The Botany of Citrus and Its Wild Relatives. In: W. Reuther, H.J. Webber and L. D. Batchelor (eds.) The Citrus Industry. vol. 1, pp. 190-430. Univ. Calif. Berkley, Calif. U. S. A.
- (7) Tanaka, T. (1961) Citrologia. Semi-centennial commemoration papers on citrus studies. Citrologia Supporting Foundation, Osaka, Japan. 114pp.

#### 英文抄録

### Germination of Pollen Grain in Citrus Cultivars from Germplasm Conservation at Kinki University

Nobumasa Nito<sup>1</sup>, Tetsuya Matsukawa<sup>1</sup>, Takuji Ito<sup>1</sup> and Takeshi Gato<sup>2</sup>

Kinki University has collected indigenous and heritage cultivars to establish a *Citrus* genebank. Number of accessions is more than 200 species and cultivars, which is one of the biggest collections in Japan. Pollen grains of 44 species and cultivars from genebank are cultured on the 1% agar medium containing 10% sucrose. Germination rate was observed after 6-hour culture under condition of 28°C and dark. The rate of pollen germination ranged from 65.2% (Ichang Lemon, *C. wilsonii* Tan.) to 3.0% (Rusk Citrange, *Poncirus* × *C. sinensis* L.). The rate of germination readily deceased after 2 months of collection under the storage condition with the silica gel desiccant at 5°C. After 5 months storage, the rate of germination of many species and cultivars reached to near zero. In addition, the names of species and cultivars were sorted according to Tanaka's system. The information obtained in the present study improves the establishment of germplasm collection at Kinki University.

1. Department of Biotechnological Science, Kinki University, Wakayama 649-6493, Japan

2. Yuasa Farm, Experiment Orchard of Kinki University, Yuasa, Wakayama 643-0004, Japan