

カンキツ類花粉の微細構造

仁藤 伸昌¹, 松川 哲也¹, 伊東 卓爾¹, 我藤 雄²

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45の種と品種・系統を用いて走査型電子顕微鏡による花粉の形態観察を行った。得られた形態的特徴が、カンキツ類の系統分類の指標のひとつとして適用できるかを検討した。花粉の表面構造の外観は、網目型であり、網目に囲まれた孔の大きさが種と品種・系統を特徴づけていた。種と品種・系統により花粉の表面構造に違いはあったが、その構造の特徴と系統分類との間に一定の傾向を見出すには至らなかった。しかし、部分的には系統分類の類縁関係を示す場合も認められ、本研究でのカンキツ類花粉の微細構造の記載は、形態に基づく系統分類のための情報のひとつとして今後の利用が期待できる。

緒論

カンキツ類は、100を超える国や地域で栽培され、果実の中で最大の生産量を産出し、この果実の恩恵を受けている人口は、リンゴやブドウを凌駕している。一般的に、カンキツ類は、ミカン亜科植物5属のうちカラタチ属 (*Poncirus*)、カンキツ属 (*Citrus*) 及びキンカン属 (*Fortunella*) に含まれる植物種であり、果実は、砂じょう (果汁が貯まる部分) とじょうのう (砂じょうを含む袋) を形成するヘスペリド果 (*Hesperidium*) によって特徴づけられている。

世界各国で広く栽培され、利用されている果実の多くは、カンキツ属を構成する種と品種・系統であり、キンカン属とカラタチ属の果実としての利用は、極く限られている。長い栽培の歴史を通じ、カンキツ属に含まれる種、栽培品種及び系統は世界各国に多数存在し、幅広い多様性を見ることができる。

カンキツ属植物の種と品種・系統の分類に関しては、古くから様々な意見が提唱されているが、確たるものはなく、依然として議論が続いている。広く受け入れられているカンキツ属の系統分類には、Swingle⁽¹⁰⁾とTanaka⁽¹¹⁾によるものである。両者の分類に対する見解の相違は、Swingleが野生種及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もあげている。

生物多様性としての生物遺伝資源及びバイオサイエンス推進のための実験生物の系統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⁽⁵⁾。近畿大学附属農場湯浅農場では1972年以来カンキツ類の種と品種・系統の収集と保存を行い、2007年3月現在、200を超える種と品種・系統を維持し、さらに拡充を図っている。これらの植物体を用い、わが国在来種の発祥、発祥の基になった種と品種・系統の検証などの研究を推進すると同時に、保存している種と品種・系統品種名の記載などの不確実性と混乱を正すための検討も行っている⁽⁷⁾。今までに、花器の特性について、花卉長、花粉粒の大きさ、アセトカーミンによる染色性⁽⁶⁾、貯蔵期間を追っての花粉の発芽の状況などについて研究⁽⁷⁾を行った。

原稿受付 2008年11月21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 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

本研究では花器に関する研究の一部として、走査型電子顕微鏡による花粉粒の表面構造を調査した。

材料及び方法

近畿大学附属農場湯浅農場のカンキツ類系統保存園から45の種と品種・系統の花粉を採取した。本研究でのカンキツ類の種と品種・系統の分類は、Tanaka⁽¹¹⁾の分類に基づく学名に準拠し、図中に示した。学名が未同定または不明のものは、導入時に記載された品種・系統名とし、漢字で表記した⁽⁷⁾。

材料とした植物体の開花は、4月末から5月末まで続いたので、それぞれの種と品種・系統の開花期にあわせて材料の採取を行った。花卉が反転していない開花直前の花を選び、採取当日の開花が確実にあろう花を採取した。目安としては、花の先端部を指で軽くつまんだ時、閉じていた花卉が反転し開く状態であった。

採取後の花は、蒸れるのを防ぐために紙袋に入れ、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1Lのデシケーターに入れ5℃の冷蔵庫中で実験に用いるまで保存した。

花粉を葉包紙上に広げ、モレキュラーシーブ3A(ビーズ)で脱水した100%エチルアルコールを滴下し、花粉の膨潤と固定を行った。室温にてエチルアルコールを蒸散させた後に、走査型電子顕微鏡試料台の粘着テープに貼付した。イオンスパッター(日立E-1010、白金/パラジウム合金)を用い、8mAで4分間蒸着を行った。SEM(日立S-2250N)により15ないし20kV、3000倍の条件で、赤道面側と極側(極観像)⁽⁸⁾の観察を行った。固定時に十分に膨潤し、観察の視野の中から、種と品種・系統を代表すると判断した花粉粒を撮影した。

結果及び考察

SEMによる観察に先立ち乾燥した花粉とエチルアルコールで膨潤・固定した花粉の比較を行った。採取し、乾燥状態で保存した花粉の一例としてイーチャンレモンを、Fig. 1に示す。花粉は、長楕円形で、長径に沿ってくびれた‘溝’⁽¹²⁾があり、発芽口が観察された。100%エチルアルコールを滴下すると、瞬時に膨潤し、乾燥後もその形の特徴を維持した(Fig 2、(23)参照)。また、先の実験においてアセトカーミン溶液で染色された花粉及び発芽のために寒天培地上で培養した花粉粒は膨潤した形であった。これらのことから、開花時に雌ずいの柱頭に付着した花粉は膨潤した形と思われ、本研究でのSEM像が花粉の特徴を示すものと判断した。

極側からの極観像では、いずれの種と品種・系統でも‘溝’の数は、3、4及び5が混在した。しかし、本研究で用いた材料では、85ないし99%の花粉において‘溝’の数が4であったので、主として‘溝’の数4の花粉を撮影した。同一植物種において‘溝’数に差があることは、他の植物でも見られる^(1, 12, 13)。

花粉のSEM像は、本学保存の品種・系統をTanaka⁽¹¹⁾の分類によって記述した順番⁽⁷⁾とした。図中の10 μ mのスケールにやや違いはあるが、アセトカーミン染色による光学顕微鏡下の花粉粒の直径の測定では、コベニミカンの28.4 μ mが最小で、最大はヤツシロの39.2 μ mであった⁽⁶⁾。

カンキツ類の花粉の表面構造の外観は、網目型、微穿孔型及び小孔型⁽⁸⁾であったが、外壁断面の構造を考慮すると、基本的には、網目型であり、網目に囲まれた孔の大きさに品種ごとに違いがあると判断した。スイートライム(1)は、明確な網目状であったが、他は、不整形の孔であった。孔の大きさと分布は種と品種・系統により異なっていた。キヌカワ(5)、タンカン(高しょう系)(15)、ハナユ(20)、ジャバラ(34)及びラスクシトレンジ(44)は、やや小さな孔であった。他の種と品種・系統の孔はさらに小さかった。とくに水晶文旦(3)とタチバナ(30)の網目の孔は明確に小さかった。

菊蜜柑(39)の形態は、表面に凹凸があり他の品種・系統の形態とは異なっていた。しかし、この品種

の開花時の採集直後の発芽試験での発芽率は 17.6%であり、不稔花粉ではなかった⁽⁷⁾。

ブンタン類の安政柑 (2)、水晶文旦 (3) 及び平戸文旦 (4) は、同一の形態とは言い難いが、孔が小さいことは共通していた。また、タンカン 2 系統 (15 と 16) では形態に共通性を見ることはできなかった。ポンカンの 2 系統 (28 と 29) では、孔の分布に差が見られた。

ラスクシトレンジ (44) は、カラタチ (43) と ‘ルビー’ オレンジとの属間雑種 (*Poncirus* × *Citrus*) であり、また、トーマスビルシトレンジカット (45) はキンカン × シトレンジ (カラタチ × オレンジ) (*Fortunella* × (*Poncirus* × *Citrus*)) の交配により育成されたものであるが、カラタチの特徴を引き継ぐ特徴を見ることはできなかった。キンカンの開花期は 7 月であり、今回用いた種と品種・系統と開花期を異にするので材料として提供できなかった。今後の検討課題としたい。

Fig. 2 に示したように、カンキツ属の種と品種・系統は、それぞれ異なった花粉の表面構造であった。しかし、種と品種・系統による構造の特徴に一定の傾向を見出すことはできなかった。本研究においては、それらの差異の解析方法の検討にまで至らなく、系統分類のための情報として、また本研究に用いた種と品種・系統の Tanaka⁽¹¹⁾ による分類への位置付けを明確にすることはできなかった。Fukuda ら⁽¹⁾ は、ミカン科ミヤマシキミ属で、また Verellen ら⁽¹³⁾ は、アカネ科 *Coptosapelta* 属植物の花粉の形態に基づき、分類学的考察を行っている。花粉の形態が系統分類の指標になる可能性は高い。しかし、部分的には系統分類の類縁関係を示す場合も認められたので、今後は画像処理技術の導入や情報処理技術の応用により系統分類の指標のひとつと位置付けることを検討したい。

従来、カンキツ属の系統分類には、観察を主とした形態、栽培地、生息地を考慮した地理的分布などが指標とされてきた。カンキツ属に関する系統分類の情報としては、樹勢、とげの発生、葉の形、花の構造と形、果実の形態、種子の形態などが用いられている⁽³⁾。これらの情報は、野生種及び品種改良による後代の記載を念頭に置いたものである。Swingle⁽¹⁰⁾ 及び Tanaka⁽¹¹⁾ はこれらの情報に地理的分布を加えたものである。しかし、カンキツ属の種と品種・系統の形態の記述においては、芽、葉、根、花、果実などの記載は見られるが、花粉の形態の記述は行われていない^(2, 9)。本研究におけるカンキツ属の花粉の記載は、今後の系統分類のための情報のひとつとして評価されるべきである。

カンキツ属の系統分類の研究初期から、形態学的研究及び地理的分布の研究に加えて、化学分類の手法が取り入れられてきている。近年は、生化学的及び分子生物学的研究により、より詳細な解析が進められているが、マーカーにより分類学的位置が異なることもある⁽⁴⁾。より多くの情報を比較検討しながら、未だに確立されていないカンキツの系統分類を議論すべきである。その意味において本研究の花粉の形態は系統分類の情報のひとつとして利用できる。

引用文献

- (1) Fukuda, T., A. Naiki and H. Nagamasu. 2008. Pollen morphology of the genus *Skimmia* (Rutaceae) and its taxonomic implications. *J. Plant Res.* 121: 463-471
- (2) 岩堀修一. 1999. カンキツの形態. 岩堀修一・門屋一臣編. カンキツ総論. pp. 202-212. 養賢堂.
- (3) IPGRI. 1999. Description for *Citrus*. pp. 1-66. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy
- (4) Nicolosi, E. 2007. Origin and Taxonomy. In: I.A. Khan (ed.) *Citrus Genetic, Breeding and Biotechnology*. pp.19-43. CAB International, Oxfordshire, U. K.
- (5) 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. pp. 68-73. 共立出版株式会社.
- (6) Nito, N., T. Matsukawa and T. Ito. 2007. Germplasm Conservation of Indigenous *Citrus*. *Acta Hort.* 760 (1): 105-108.

- (7) 仁藤伸昌・松川哲也・伊東卓爾. 2008. 近畿大学カンキツ類系統保存品種花粉の発芽. 近畿大学生物理工学部紀要. 22:19-24.
- (8) 日本花粉学会. 1994. 花粉学事典. pp. 386-389. 朝倉書店.
- (9) Schneider, H. 1968. The Anatomy of Citrus. In: W. Reuther, L. D. Batchelor and H.J. Webber (eds.) The Citrus Industry. vol. 2. pp. 1-86. Univ. Calif. Berkley, Calif. U. S. A.
- (10) 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.
- (11) Tanaka, T. 1961. Citrologia. Semi-centennial commemoration papers on citrus studies. Citrologia Supporting Foundation, Osaka, Japan. pp. 1-114.
- (12) 上野実朗. 1987. 花粉学研究、増補改訂版. pp.738. 風間書房
- (13) Verellen, J., E. Smets and S. Huysmans. 2004. The remarkable genus *Coptosapelta* (Rubiaceae): pollen and orbicule morphology and systematic implications. J. Plant Res. 117: 57-68.

英文抄録

Pollen morphology of *Citrus* species and cultivars maintained at germplasm conservation in Kinki University

Nobumasa Nito¹, Tetsuya Matsukawa¹, Takuji Ito¹ and Takeshi Gato²

Pollen morphology of *Citrus* species and cultivars was described by scanning electron microscope. Forty-five cultivars and strains were collected from the germplasm conservation in Kinki University. Pollen grains of *Citrus* had reticular sculptures and the size of pit differed among the species and cultivars. These characters differ from even the phylogenetically close cultivars. The anatomical studies on pollen grains of *Citrus* using scanning electron microscope are limited so far. The description of pollen grains obtained in the present study might provide one of the information on phylogeny of *Citrus* species and cultivars.

1. Department of Mechanical Engineering and Biomimetics, Kinki University, Wakayama 649-6493, Japan

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

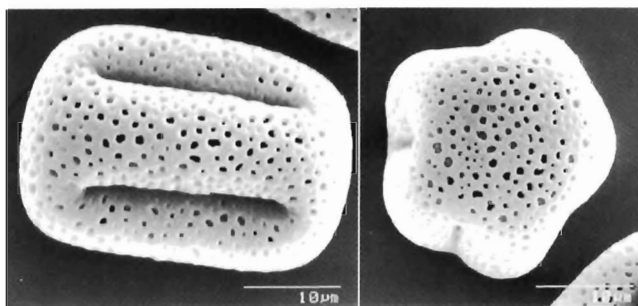
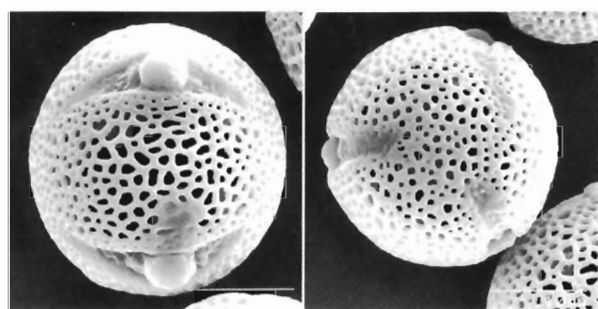
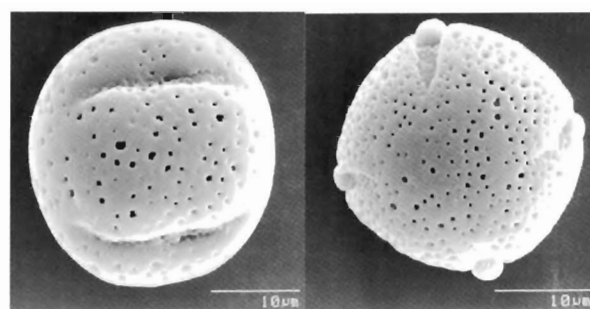


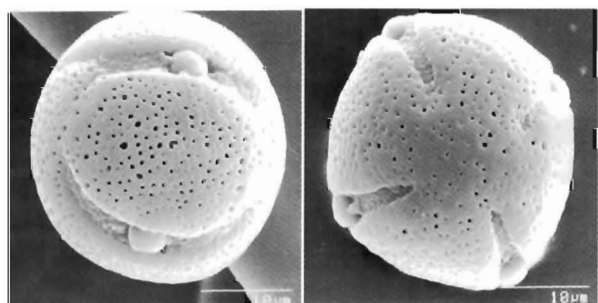
Fig. 1. Dry pollen of Ichang Lemon (23) before fixation by 100% ethyl alcohol. After the fixation, pollen grain swelled as described in Fig 2. (23).



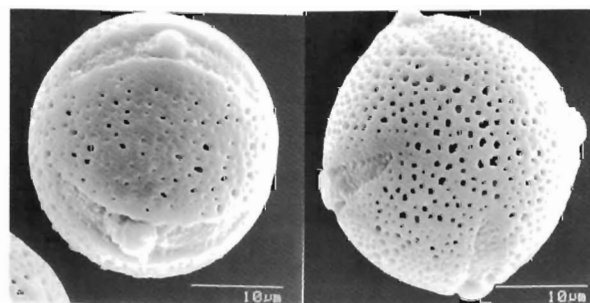
1 スイートライム
Sweet Lime
C. limettioides Tan.



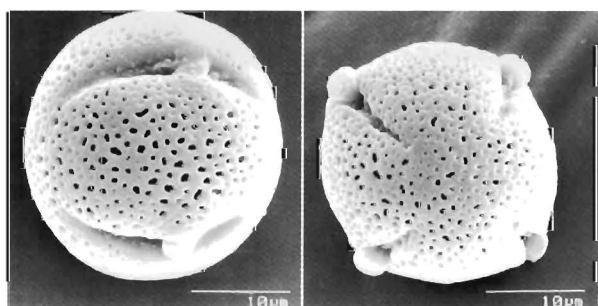
2 ブンタン (安政柑)
Pummelo (Anseikan)
C. grandis (L.) Osb.



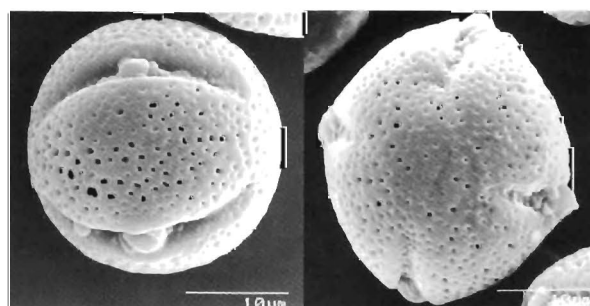
3 ブンタン (水晶文旦)
Pummelo (Suishou-buntan)
C. grandis (L.) Osb.



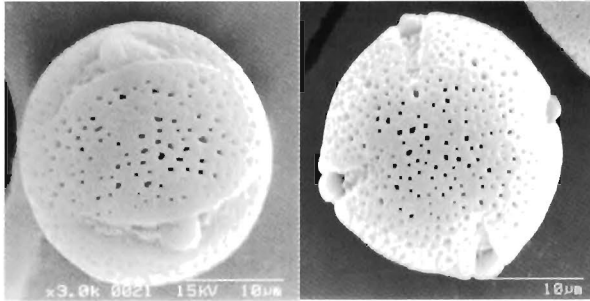
4 ブンタン (平戸文旦)
Pummelo (Hirado-buntan)
C. grandis (L.) Osb.



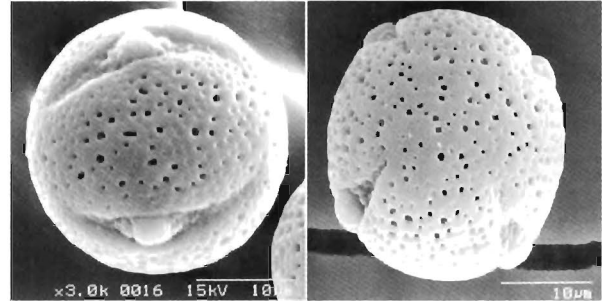
5 キヌカワ
Kinukawa
C. glaberrima Hort. ex Tan.



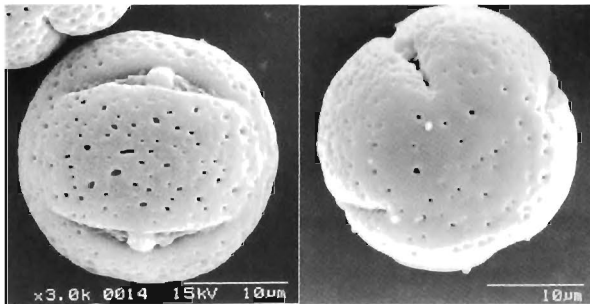
6 アサヒカン
Asahikan
C. asahikan Hort. ex Tan.



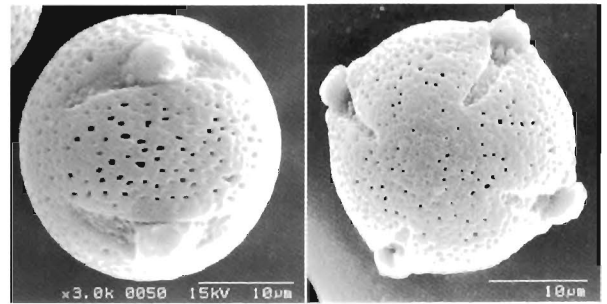
7 コトウカン
Kotokan
C. kotokan Hayata



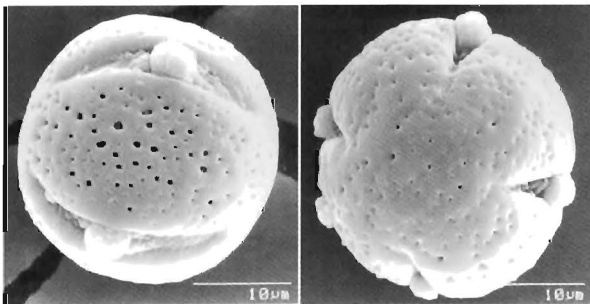
8 ハッサク
Hassaku
C. hassaku Hort. ex Tan.



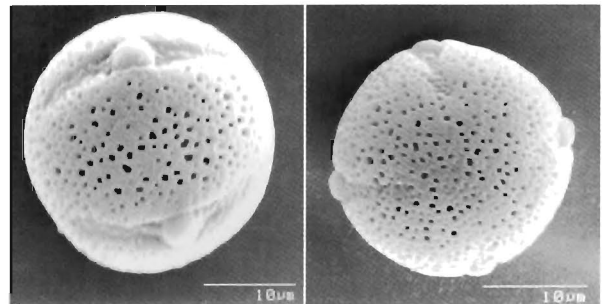
9 イワイカン
Iwaikan
C. iwaikan Hort. ex Y. Tanaka



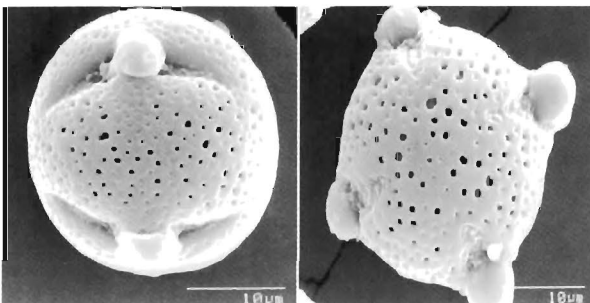
10 ナルト
Narutokan
C. medioglobosa Hort. ex Tan.



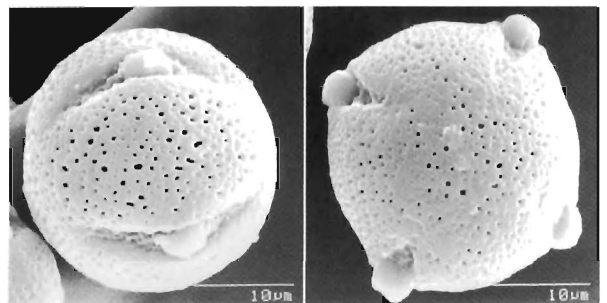
11 オオタチバナ (寿柑)
Kotobukikan
C. otachibana Hort. Y. Tanaka



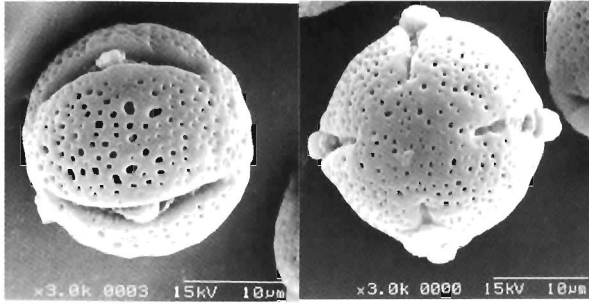
12 ヒョウカン
Hyoukan
C. ampullacea Hort. ex Tan.



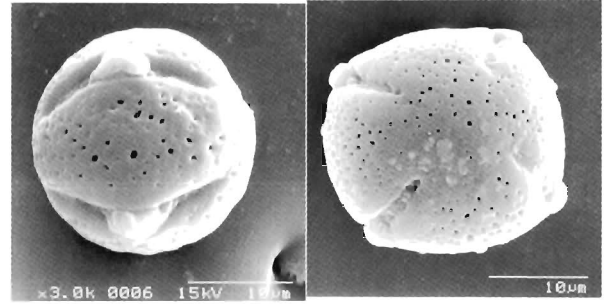
13 サンボウカン
Sanboukan
C. sulcata Hort. ex Takahashi



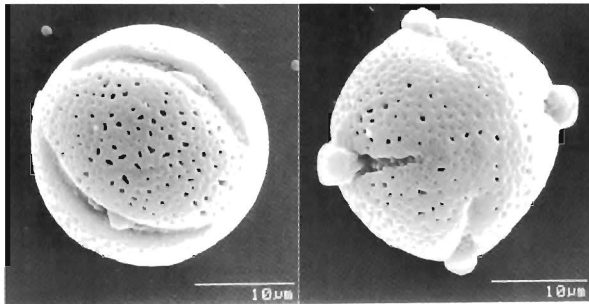
14 キクダイダイ
Kikudaidai
C. canaliculata Hort. ex Y. Tan.



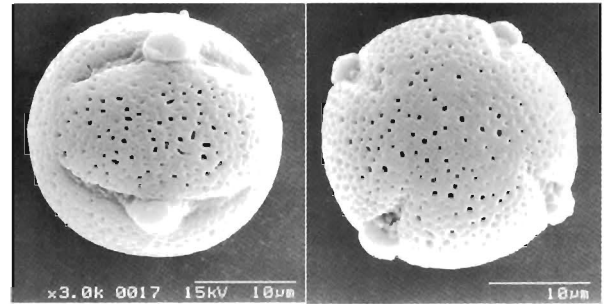
15 タンカン (高しょう系)
Koushou-Tankan (Normal form)
C. tankan Hayata



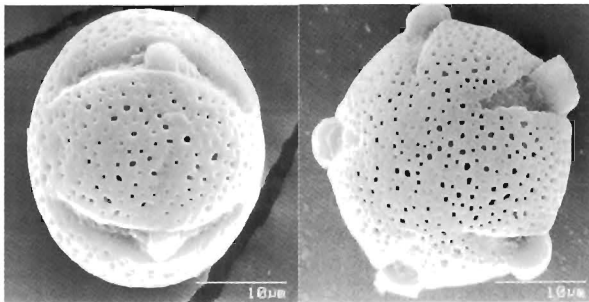
16 タンカン (低しょう系)
Teishou-Tanakan (Depressed form)
C. tankan Hayata



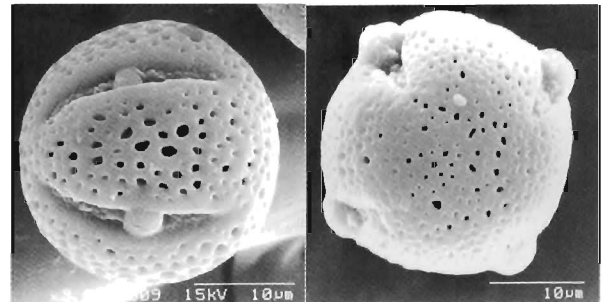
17 イヨカン
Iyo-kan
C. iyo Hort. ex Tan.



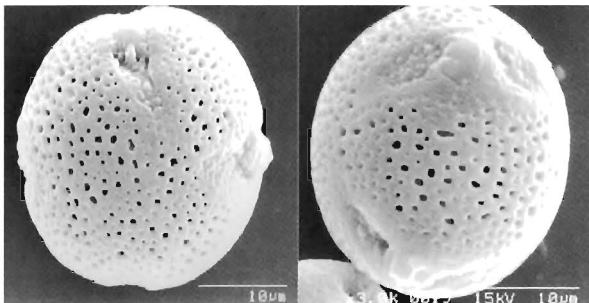
18 ヒュウガナツ
Hyuganatsu
C. tamurana Hort. ex Tan.



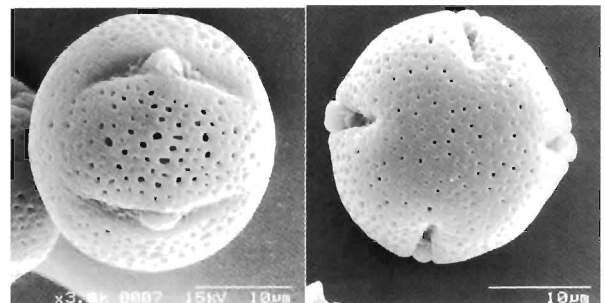
19 カワバタ
Kawabata
C. aurea Hort. ex Tan.



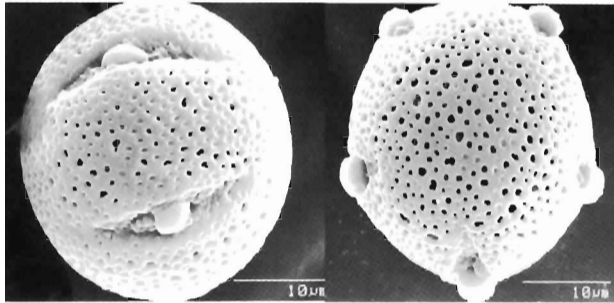
20 ハナユ
Hanayu
C. hanaju Sieb. ex Shirai



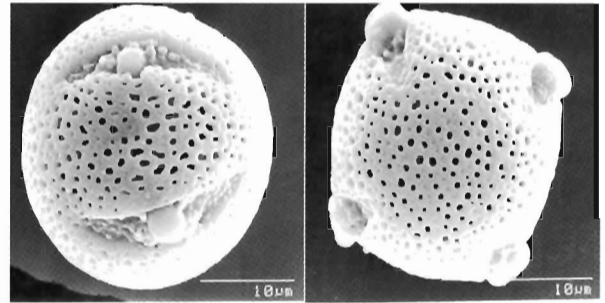
21 スダチ
Sudachi
C. sudachi Hort. ex Shirai



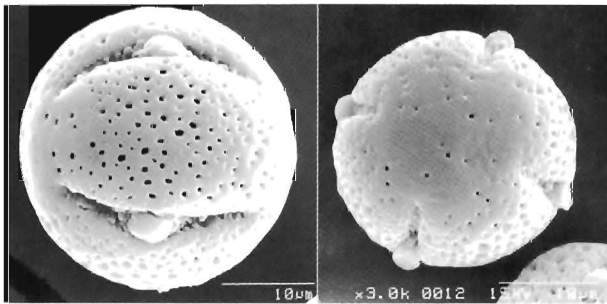
22 ユコウ
Yukou
C. yukou Hort. ex Tan.



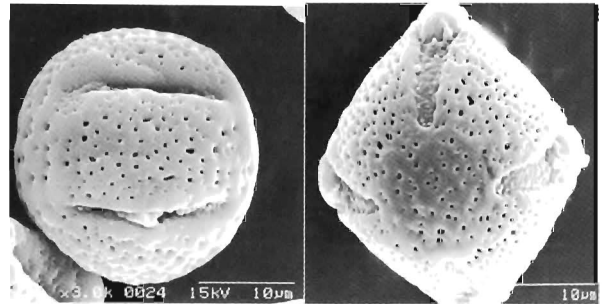
23 イーチャンレモン
Ichang Lemon
C. wilsonii Tan.



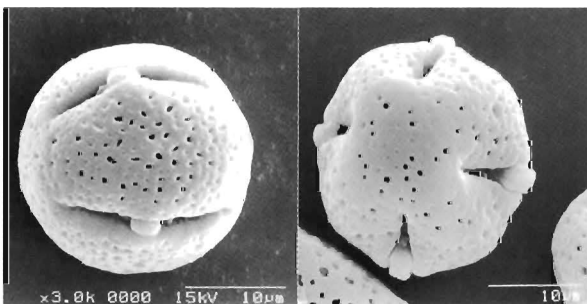
24 カボス
Kabosu
C. sphaerocarp Hort. ex Tan.



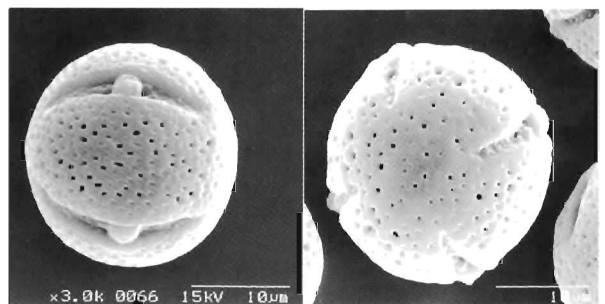
25 クネンボ
Kunenbo
C. nobilis Lour.



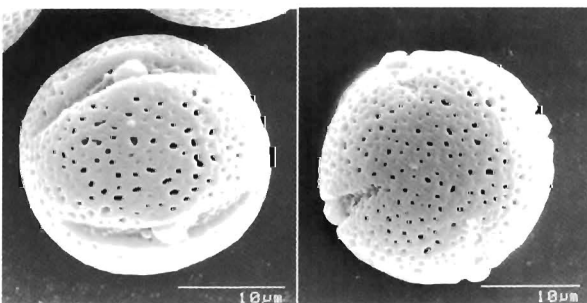
26 ヤツシロ
Yatsushiro
C. yatsushiro Hort. ex Tan.



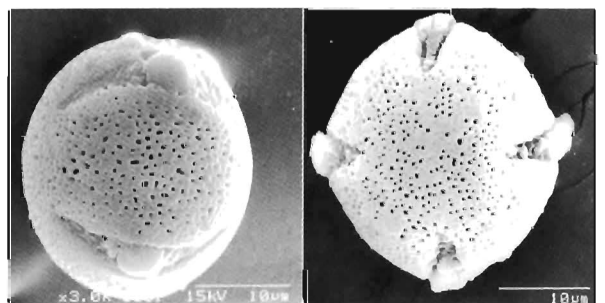
27 ケラジ
Keraji
C. keraji Hort. ex Tan.



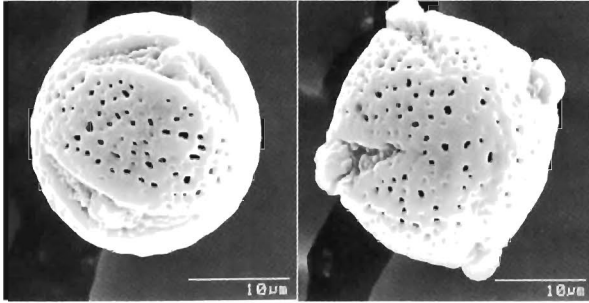
28 ポンカン (中野 3 号)
Ponkan (Nakano No 3)
C. reticulata Blanco



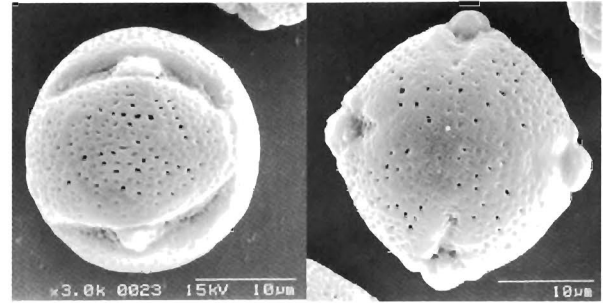
29 ポンカン (低しょう系)
Ponkan (depressed form)
C. reticulata Blanco



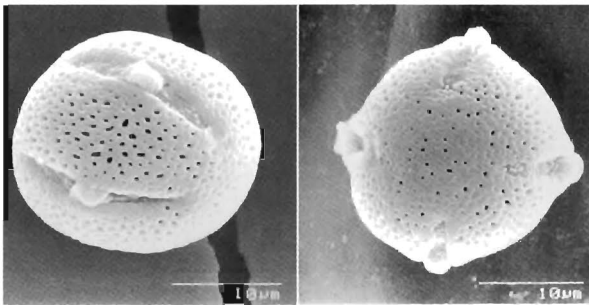
30 タチバナ
Tachibana
C. tachibana (Mak.) Tan.



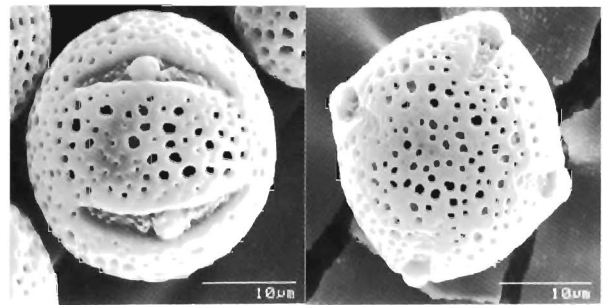
31 コベニミカン
Kobenimikan
C. erythrocarpa Hort. ex Tan.



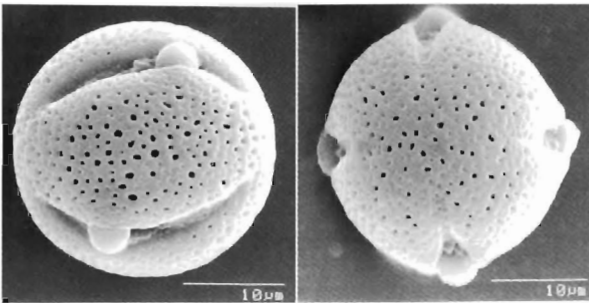
32 コウジ
Kouji
C. leiocarpa Hort. ex Tan.



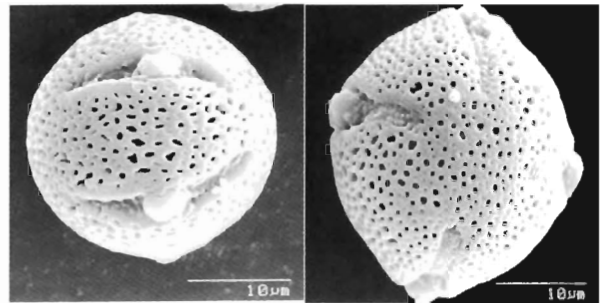
33 シキキツ
Shikikitsu
C. madurensis Lour.



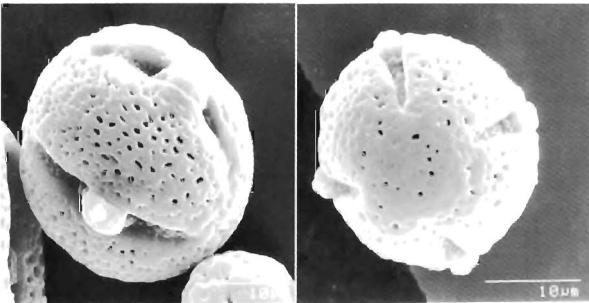
34 ジャバラ
Jabara
C. jabara Hort. ex Tan.



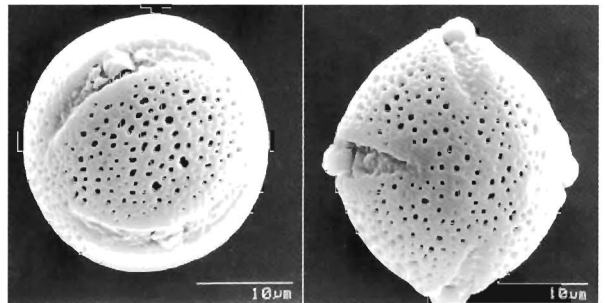
35 安藤柑
Andokan
Not identified



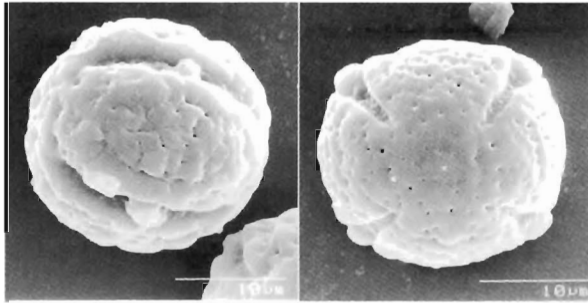
36 黄金柑
Ogonkan
Not identified



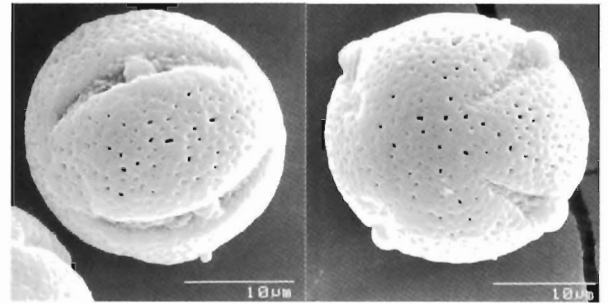
37 帯高蜜柑
Obitakamikan
Not identified



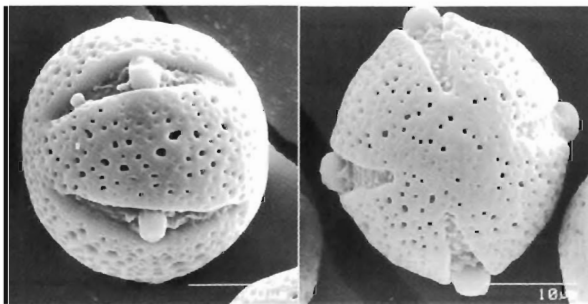
38 唐蜜柑
Karamikan
Not identified



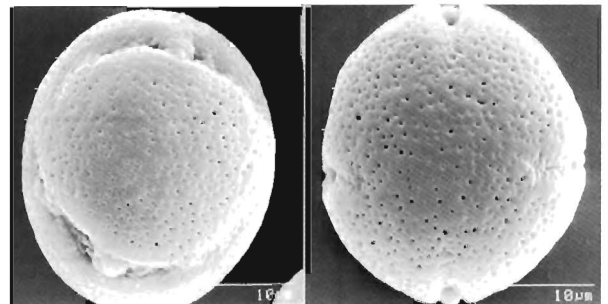
39 菊蜜柑
Kikumikan
Not identified



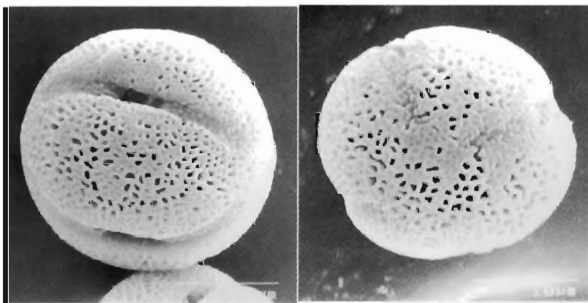
40 小林柑
Kobayashikan
Not identified



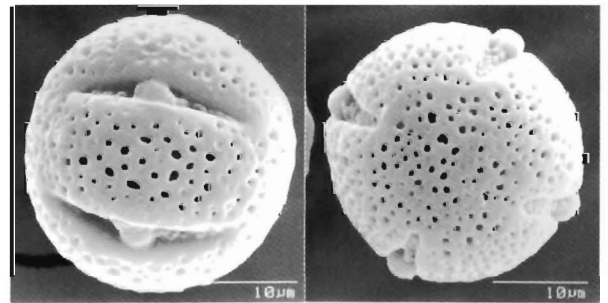
41 支那蜜柑
Shinamikan
Not identified



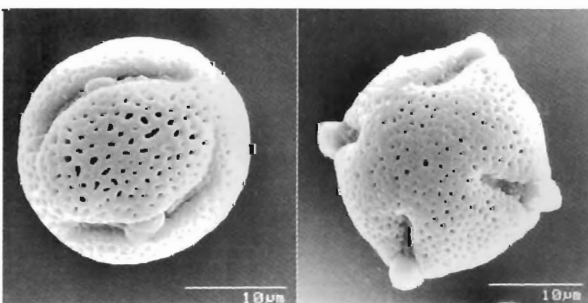
42 早柚
Hayayu
Not identified



43 カラタチ
Karatachi
Poncirus trifoliata



44 ラスクシトレンジ
Rusk Citrange
Poncirus × *C. sinensis*



45 トーマスビルシトレンジカット
Thomasville Citrangequat
Fortunella sp. × Citrange

Fig. 2. Morphology of pollen grains of *Citrus* species and cultivars.