

無核性完全甘ガキの
生産技術開発に関する研究

千々和 浩幸

2 0 1 5

*鹿児島大学 審査学位論文

目 次

緒 言	1
第 1 章 試験管内コルヒチン処理によるカキの十二倍体作出とその生育特性	3
第 2 章 徒長枝切り返しによる雄花着生品種の結果母枝育成	12
第 3 章 六倍体完全甘ガキ品種‘富有’と‘太秋’の交雑で生じた不完全種子の胚培養による九倍体作出	19
第 4 章 無核性完全甘ガキ品種‘福岡 K1 号’の育成ならびにジベレリン散布と摘蕾による結実安定効果	26
第 5 章 九倍体花粉の受粉がカキ‘富有’の結実ならびに果実品質に及ぼす影響	33
総合考察	41
摘 要	44
謝 辞	46
引用文献	47
Summary	51

緒 言

カキ (*Diospyros kaki* Thunb.) は東アジア原産の果樹で、日本では古くから栽培されてきた。日本における主要な経済栽培品種は‘富有’，‘次郎’，‘平核無’とそれらの枝変わり品種であり，作付面積全体の 70%以上を占めている。なかでも完全甘ガキ品種である‘富有’は栽培面積の約 30%を占めるが，単為結果力が弱く（梶浦，1943；永沢ら，1968），安定生産のためには受粉樹の混植により種子を形成させる必要があり，その種子の多さにより食べにくい。また，食味が若年層の嗜好性に必ずしも適合していないことなどから，消費が低迷している。近年，農林水産省果樹試験場で‘富有’を母親として育成された‘太秋’は，大果・良食味であり（山根ら，1995），市場評価も高いため栽培面積が増加傾向にある。‘太秋’は単為結果力が比較的強いが（森口ら，2006），‘富有’を主体とするカキ産地では多くの受粉樹が栽植されているため，大部分が有核果実となる。

一方，不完全渋ガキ品種である‘平核無’やその枝変わりである‘刀根早生’は無核性の品種であり，食べやすく消費者の嗜好性に適合した果実品質特性を有している。

‘富有’や‘太秋’などカキ品種の多くは六倍体 ($2n=6x=90$) であり，有核であるが（Namikawa・Higashi，1928），‘平核無’や‘刀根早生’は種内三倍体に相当する九倍体 ($2n=9x=135$) であるため無核となる（庄ら，1990）。しかしながら，先述したようにこれらの品種はいずれも渋ガキであるため脱渋が必要であり，脱渋後の日持ち性の低下が大きな問題である（石丸ら，2001）。したがって，九倍体の完全甘ガキを育成することができれば，脱渋の必要がない無核性果実が生産できるものと考えられる。

無核の完全甘ガキとなる九倍体を作出するためには，十二倍体と六倍体を交雑することが有効と考えられるが，十二倍体は自然界には存在しないため，人為的に作出する必要がある。しかし，カキの染色体倍加に関する報告は少なく，‘次郎’や‘駿河’のプロトプラストを材料に用いた事例はあるが，高品質の無核甘ガキ品種を育成するためには，再分化系が確立されている品種を材料として用いることが必要であり，適用できる品種が限定される（Tamura ら，1995，1996）。そのため，再分化系が確立されていない品種でも利用可能な染色体倍加法の開発が望まれる。

カキの育種上における問題として，着花特性があげられる。カキは雌雄異花であり，雄花を着生する特性を有する品種では，雌花の着生が不安定である（千々和ら，1997；林ら，2001；米森ら，1992）。そのため，雄花を着生する品種を種子親として利用する場合には，雌花を安定的に着生させることが課題である。

また，カキ育種においては甘渋性についても考慮する必要がある。カキは甘渋性により完全甘ガキ（PCNA）と非完全甘ガキ（non-PCNA）に大別され，さらに非完全甘ガキは種子の脱渋力の高低により，不完全甘ガキ（PVNA），不完全渋ガキ（PVA）および完全渋ガキ（PCA）に分類される（Sugiura・Tomana，1983）。完全甘ガキは，非完全甘ガキに対して遺伝的に劣性であるため，一回の交雑で効率よく完全甘ガキを育成するためには，完全甘ガキ同士の交雑を行う必要がある（池田ら，1985）。

先述したように，無核の九倍体品種を育成するには十二倍体と六倍体を交雑する

方法もあるが、カキは幼若性が強い樹種であり、交雑・採種・播種から開花・結実までに長い年月を要することから、中間母本として十二倍体品種を用いる場合には、さらに長い年月が必要となるため、育種年限の短縮化が大きな課題である。

一方、カキと同様に無核性が重要な育種目標であるカンキツでは、二倍体間の交雑で生じた不完全種子から三倍体が得られることが知られている (Esen・Soost, 1971 ; Oiyama・Okudai, 1983) 。カキにおいても、六倍体間交雑で不完全種子が生じることがあり、これが倍数性変異に起因しているものであれば、これを育種素材とすることにより育種年限を短縮できる可能性がある。

また、実際の栽培現場では、育種による無核品種の育成だけでなく、既存の有核品種において無核の果実を生産する技術の開発も必要とされている。‘平核無’や‘刀根早生’は、単為結果性を持つとともに、六倍体受粉樹の花粉との受精後に胚の成長が途中で停止する偽単為結果性を示す (傍島ら, 1975) 。もし逆に、六倍体品種に九倍体の花粉を受粉することで、同様の偽単為結果を誘起することができれば、‘富有’などの既存品種の無核果実を安定的に生産できる可能性がある。これまで、カキには九倍体品種で雄花を着生するものが存在しなかった。近年、Sugiura ら (2000) は雄花を着生する九倍体系統の作出に成功している。しかし、これら九倍体系統の花粉稔性やその受粉が六倍体品種の結実や果実品質に及ぼす影響については不明である。

以上のことから本研究では、無核性の完全甘ガキ品種の育成および既存品種の無核化技術の開発を目的とし、以下の研究を行った。まず、無核性完全甘ガキ育種のための中間母本となる十二倍体完全甘ガキを作出するため、コルヒチンを用いた簡易な染色体倍加法を開発し、得られた十二倍体の育種母本としての利用の可能性を検討した。次に、十二倍体との交雑組合せにおいて、種子親としての利用が可能となるよう、六倍体の雄花着生品種に雌花を安定的に着生させる方法について検討した。先述したように、十二倍体と六倍体の交雑から九倍体を作成するためには、中間母本である十二倍体の作出と、さらに六倍体との交雑を経る必要があり、長い年月を要する。そこで、育種年限を短縮するため、六倍体完全甘ガキ品種間の交雑で生じる不完全種子から九倍体の作出を試み、無核性完全甘ガキ品種の育成を行なった。さらに、九倍体系統の花粉を用いた受粉により既存の品種の無核果生産技術について検討した。

第1章 試験管内コルヒチン処理によるカキの十二倍体作出とその生育特性

1.1 緒 言

カキ (*Diospyros kaki* Thunb.) は基本的な倍数性が六倍体 ($2n=6x=90$) であるが、‘平核無’や‘刀根早生’などの九倍体 ($2n=12x=135$) 品種はいずれも無核性であり (Namikawa・Higashi, 1928 ; 庄ら, 1990, 1992), 食べやすく消費者の嗜好性に適合した果実品質特性を有している。しかし, これら無核性品種はすべて渋ガキであるため, 脱渋のための手間や施設が必要になるとともに, 脱渋後の日持ち性低下も問題となる。従って, 脱渋の必要がない九倍体で無核性の完全甘ガキの育成が望まれる。これまでカキの九倍体を作出した事例としては, 非還元花粉を用いた手法が報告されているが (Sugiura ら, 2000), その利用は非還元花粉を生じる品種に限られ, さらに花粉の選別などが必要となるため, 必ずしも効率は高くない。効率的に九倍体を作出するには, 十二倍体と六倍体を交雑することが有効な方法と考えられる。しかし, 自然発生した十二倍体のカキの存在は認められないため, 人為的に十二倍体個体を作出する必要がある。ブドウ (Notsuka ら, 2000 ; 山根・栗原, 1980), ビワ (八幡ら, 2004), カンキツ (金好ら, 2008) など多くの樹種では, 人為的に二倍体の染色体を倍加して四倍体を作るために, コルヒチン処理が行われている。しかし, カキの染色体倍加に関する報告は少なく, これまで‘次郎’のプロトプラストにコルヒチンを処理して十二倍体を作出した事例が見られる程度である (Tamura ら, 1996)。このような組織培養系を用いた染色体倍加手法の適用は, 再分化系が確立されている品種に限られるため, 育種手法としての利用は限定的である。また, カキの甘渋性の遺伝に関して, 完全甘 (PCNA) は非完全甘 (non-PCNA) に対して劣性であるため, 効率的に完全甘ガキを育成するためには, 完全甘ガキ間の交雑を行う必要がある (池田ら, 1985)。

そこで本章では, 完全甘ガキの十二倍体育種母本を作出するため, 六倍体完全甘ガキ品種間の交雑実生に対するコルヒチンの処理の効果とその条件を明らかにするとともに, 得られた十二倍体系統の生育特性を調査し, 育種母本としての利用の可能性を検討した。

1.2 材料および方法

1.2.1 試験管内コルヒチン処理によるカキ実生の染色体倍加

2003 年と 2004 年に‘富有’および‘新秋’の開花前の雌花に袋掛けをし, 他の花粉の混入を防止した。満開期に除袋後‘甘秋’, ‘貴秋’および‘太秋’の花粉を用いて第 1-1 表に示した 4 交雑組合せで受粉を行った。受粉 70~90 日後に果実を採取して種子から胚を摘出し, 3%ショ糖を含むホルモンフリーの窒素成分を半減した (以下 1/2 N) MS 培地 (Murashige・Skoog, 1962) で培養した。培養開始から 10~14 日後に子葉が展葉・緑化した実生の茎頂部を, コルヒチンを含む 0.7%寒天培地に埋没させた。コルヒチン濃度は 0.03, 0.05 および 0.1%とし, 処理時間は 12, 24, 48 および 72 時間とした。処理終了後, 滅菌水でコルヒチンを洗い流し, 再び

ホルモンフリーの 1/2 N MS 培地で根とシュートの伸長を促進させた。処理 2 か月後までに茎頂部から本葉が 2 枚以上展葉したものを生存個体として生存率を算出した。生存個体の 2~4 枚目の本葉を採取し、葉片約 0.5 cm²に 400 µL の核単離溶液 (Partec CyStain UV precise P Extraction Buffer) を加え、チョッピング法により核を遊離させた後、50 µm のナイロンメッシュでろ過した。これに 1.6 mL の蛍光色素溶液 (DAPI) を加えた後、プロイディアナライザー (Partec, PA 型) で蛍光強度を測定し、六倍体である‘富有’を基準として倍数性を推定した。また、‘富有’×‘甘秋’ならびに‘富有’×‘貴秋’の実生のうち、プロイディアナライザーで染色体が倍加したことが認められた個体をそれぞれ 1 系統ずつ供試し、シュートの基部を 1.25 mM IAA 溶液に 30 秒浸漬してホルモンフリーの 1/2 N MS 培地で発根を促進した (Tao ら, 1988)。発根後、根端を採取し、2 mM 8-オキシキノリンに 5℃で 3~8 時間浸漬し、エタノール：酢酸 (3:1) 液で固定した。固定した根端を蒸留水で洗浄し、酵素液 (4% Cellurase Onozuka RS (Yakult), 1% Pectolyase Y-23, 0.075M KCl, 7.5mM Na₂EDTA, pH4.0) に 37℃で 1 時間インキュベートした後プレパラート上で細胞を拡散させ、水洗後 2% ギムザ液 (0.1 M リン酸二ナトリウム, 0.1 M リン酸一ナトリウム, pH6.8) で染色して染色体を観察した (庄ら, 1990)。

1.2.2 染色体倍加したカキ実生の特性

プロイディアナライザーにより染色体倍加が確認された個体を、コルヒチン処理 4 か月後に直径 15 cm のプラスチックポットに鉢上げし、順化させた。2006 年に各交雑組合せの中から生育良好な個体をそれぞれ 1 系統ずつ選び、各個体から新梢 5 本、葉 5 枚を供試し、新梢長、葉面積を測定し、交雑親を対照として比較した。また、約 1 cm²に切った葉片を蒸留水中で煮沸・放冷した後、裏面の表皮をはぎ取り顕微鏡下で撮影し、気孔密度および孔辺細胞長を測定した。さらに、‘富有’×‘甘秋’と‘富有’×‘貴秋’の交雑組合せで得られた十二倍体個体の中から、生育が比較的良好な個体をそれぞれ 5 および 4 系統ずつ選び、その休眠枝を 2007 年に 4 年生‘富有’へ高接ぎし、新梢の伸長を促進した。また、同じ交雑組合せで得られた六倍体個体の休眠枝をそれぞれ 14 および 15 系統ずつ高接ぎし、高接ぎ後 4 年目に当たる 2010 年に花蕾着生の有無を調査した。さらに、十二倍体個体のうち、雄花を着生したものについて、15% ショ糖溶液中で 10 分間吸水させた花粉を顕微鏡下で撮影し、各系統約 50 粒について直径を測定した。また、15% ショ糖を含む 1% 寒天培地に花粉を置床して、3 時間後に約 50 粒×3 反復、合計約 150 粒について発芽率を調査した。

1.3 結 果

1.3.1 試験管内コルヒチン処理によるカキ実生の染色体倍加

コルヒチン処理の濃度と時間の違いがカキ実生の染色体倍加に及ぼす影響を第 1-1 表に示した。いずれの交雑組合せにおいても、コルヒチンの処理濃度が高くなると生存率が低くなり、0.1% では大幅に低下した。また、処理時間が長くなると処理後の生存率は低くなる傾向が見られ、48 時間以上の処理で低下が著しかった。ま

た，これらの区では供試数に対する十二倍体の割合（以下，十二倍体獲得率）も低かった．処理後の生存率には交雑組合せによる差が見られ，‘富有’を種子親とした実生では，‘新秋’を種子親とした実生よりも生存率が高い傾向が見られたが，生存個体中には六倍体や倍数性キメラ個体が多かった．一方，交雑組合せの違いによる十二倍体獲得率に差は見られなかった．今回の交雑組合せにおいては，コルヒチン濃度は 0.03～0.05%，処理時間は 12～24 時間の区で十二倍体獲得率が平均 11.2%と最も効率的に染色体が倍加できた．また，プロイディアナライザーによる測定で十二倍体と推定された個体の根端の染色体数は 180 本であり，コルヒチン処理により染色体倍加していることが確認できた（第 1-1 図）．

第1-1表 コルヒチン処理^zの濃度と時間の違いがカキ実生の染色体倍加に及ぼす影響

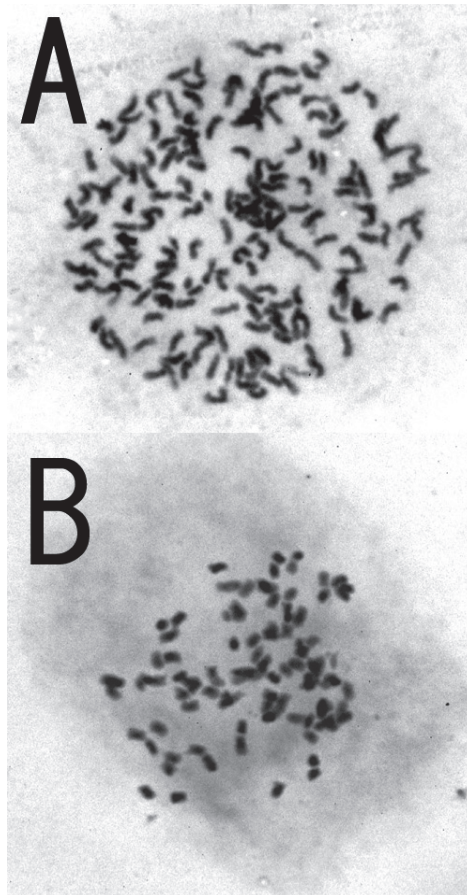
交雑組み合わせ	コルヒチン濃度 (%)	処理時間 (h)	供試数	生存率 ^y (%)	生存個体の倍数性		
					6x	6x+12x ^x	12x
富有×甘秋	0.03	12	41	65.9	12 (29.3) ^w	9 (22.0)	6 (14.6)
		24	51	54.9	8 (15.7)	13 (25.5)	7 (13.7)
		48	24	20.8	1 (4.2)	2 (8.3)	2 (8.3)
		72	27	18.5	1 (3.7)	3 (11.1)	1 (3.7)
	0.05	12	34	41.2	5 (14.7)	5 (14.7)	4 (11.8)
		24	35	40.0	3 (8.6)	7 (20.0)	4 (11.4)
		48	23	30.4	5 (21.7)	2 (8.7)	0 (0.0)
		72	26	15.4	2 (7.7)	2 (7.7)	0 (0.0)
	0.10	12	24	8.3	0 (0.0)	1 (4.2)	1 (4.2)
		24	21	9.5	0 (0.0)	1 (4.8)	1 (4.8)
		48	20	5.0	1 (5.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
		72	20	0.0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
富有×貴秋	0.03	12	22	72.7	7 (31.8)	6 (27.3)	3 (13.6)
		24	22	50.0	5 (22.7)	3 (13.6)	3 (13.6)
		48	14	28.6	1 (7.1)	2 (14.3)	1 (7.1)
		72	10	20.0	1 (10.0)	1 (10.0)	0 (0.0)
	0.05	12	22	54.5	3 (13.6)	6 (27.3)	3 (13.6)
		24	22	40.9	3 (13.6)	4 (18.2)	2 (9.1)
		48	16	25.0	1 (6.3)	3 (18.8)	0 (0.0)
		72	10	0.0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	0.10	12	8	12.5	0 (0.0)	1 (12.5)	0 (0.0)
		24	8	25.0	0 (0.0)	1 (12.5)	1 (12.5)
		48	8	0.0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
		72	10	10.0	1 (10.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
新秋×太秋	0.03	12	23	39.1	4 (17.4)	3 (13.0)	2 (8.7)
		24	23	34.8	3 (13.0)	0 (13.0)	5 (21.7)
		48	21	14.3	2 (9.5)	1 (4.8)	0 (0.0)
		72	18	0.0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	0.05	12	21	14.3	0 (0.0)	1 (4.8)	2 (9.5)
		24	27	29.6	1 (3.7)	5 (18.5)	2 (7.4)
		48	24	4.2	0 (0.0)	1 (4.2)	0 (0.0)
		72	25	4.0	0 (0.0)	1 (4.0)	0 (0.0)
	0.10	12	21	4.8	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (4.8)
		24	20	10.0	0 (0.0)	2 (10.0)	0 (0.0)
		48	15	0.0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
		72	15	0.0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
富有×太秋	0.03	12	17	70.6	5 (29.4)	4 (23.5)	3 (17.6)
		24	53	32.1	7 (13.2)	6 (11.3)	4 (7.5)
		48	13	53.8	4 (30.8)	3 (23.1)	0 (0.0)
		72	13	30.8	3 (23.1)	0 (0.0)	1 (7.7)
	0.05	12	19	31.6	4 (21.1)	1 (5.3)	1 (5.3)
		24	11	27.3	1 (9.1)	2 (18.2)	0 (0.0)
		48	16	12.5	2 (12.5)	0 (0.0)	0 (0.0)
		72	15	26.7	3 (20.0)	1 (6.7)	0 (0.0)

^z播種10～14日後に成長点をコルヒチンを含む寒天培地に埋没させた

^y生存個体は処理2か月後に本葉が2枚以上展葉したものとした

^x6x+12xはキメラ個体を示す

^wカッコ内は供試数に対する割合 (%) を示す



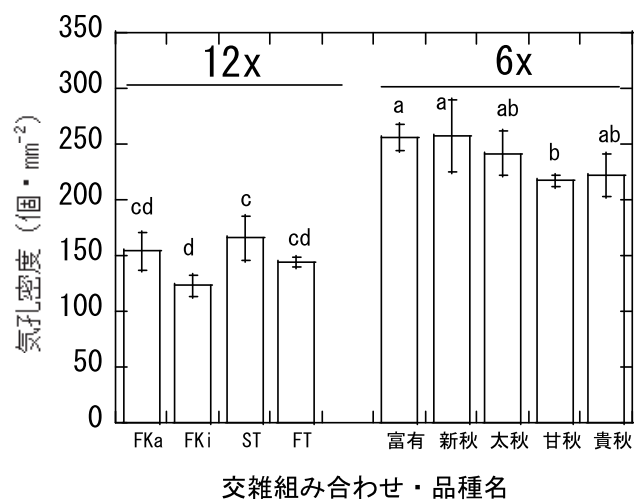
第 1-1 図 染色体倍加個体と六倍体の染色体

A : 染色体倍加個体 ($2n=12x=180$) B : 六倍体個体 ($2n=6x=90$)

1.3.2 染色体倍加したカキ実生の特性

コルヒチン処理で得られた十二倍体個体は、生育が悪く鉢上げ後に伸長停止するものが多かったが、生育が良好な個体も一部得られた。六倍体である交雑親品種の気孔密度は平均で $239 \text{ 個} \cdot \text{mm}^2$ であるのに対し、十二倍体個体では平均で $147 \text{ 個} \cdot \text{mm}^2$ と 60% 程度であった（第 1-2 図）。また、交雑親品種の孔辺細胞の長さは平均で $31 \mu\text{m}$ であるのに対し、十二倍体個体では $38 \mu\text{m}$ と、六倍体の 1.2 倍程度であった（第 1-3, 1-4 図）。一方、葉面積や新梢長には差は見られなかった（データ略）。

高接ぎ後 4 年目になると、六倍体個体では大部分が花蕾を着生したのに対し、十二倍体個体では‘富有’×‘甘秋’と‘富有’×‘貴秋’でそれぞれ 1 系統ずつ、合計 2 系統のみが花蕾を着生した（第 1-2 表）。これら十二倍体個体はいずれも雌花と雄花の両方を着生した。交雑親品種における花粉の直径は平均で $52 \mu\text{m}$ であるのに対し、十二倍体個体の花粉では $65 \mu\text{m}$ と 1.3 倍程度であった（第 1-3 表）。また、これらの花粉の発芽率はいずれも約 13% で‘甘秋’よりも低いものの、‘貴秋’と同程度であった（第 1-3 表, 第 1-5 図）。これらの花粉を六倍体品種の雌花に人工受粉したところ、不完全種子のみが形成された。一方、十二倍体個体の雌花に六倍体品種の花粉を人工受粉したところ、完全甘ガキの果実を結実したが、種子は形成されなかった（データ略）。



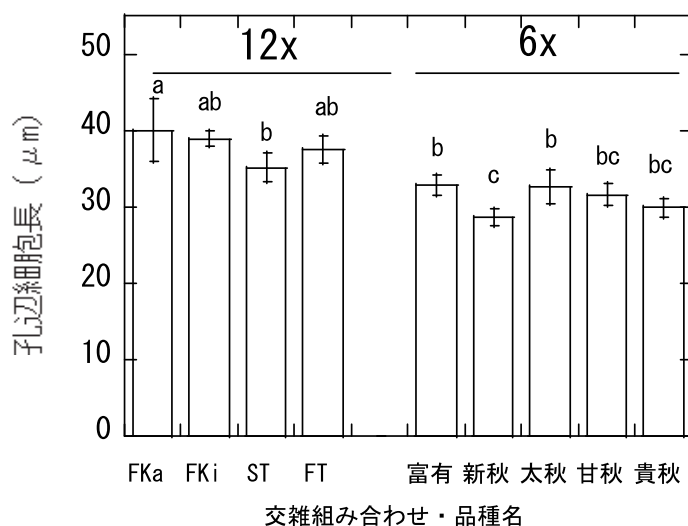
第 1-2 図 染色体倍加個体と交雑親品種の葉裏面の気孔密度

12x は染色体倍加個体，6x は交雑親を示す

交雑組み合わせ略号は，FKa：富有×甘秋，FKl：富有×貴秋，ST：新秋×太秋，FT：富有×太秋を示す

垂線は標準偏差（n=5）を示す

アルファベットは Tukey の多重比較により異なる文字間に 5%水準で有意差があることを示す



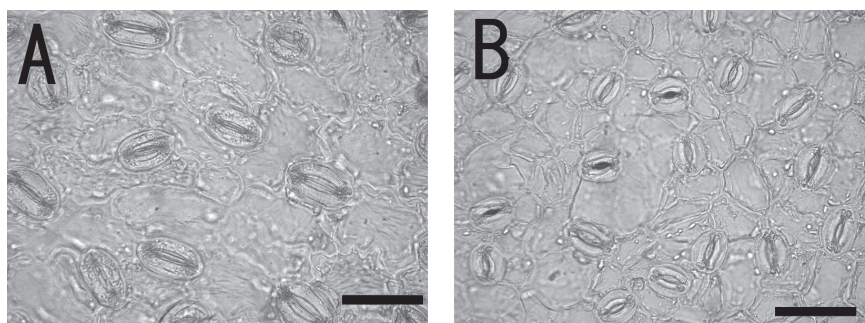
第 1-3 図 染色体倍加個体と交雑親品種の葉裏面の気孔の大きさ

12x は染色体倍加個体，6x は交雑親を示す

交雑組み合わせ略号は，第 1-2 図参照

垂線は標準偏差（n=5）を示す

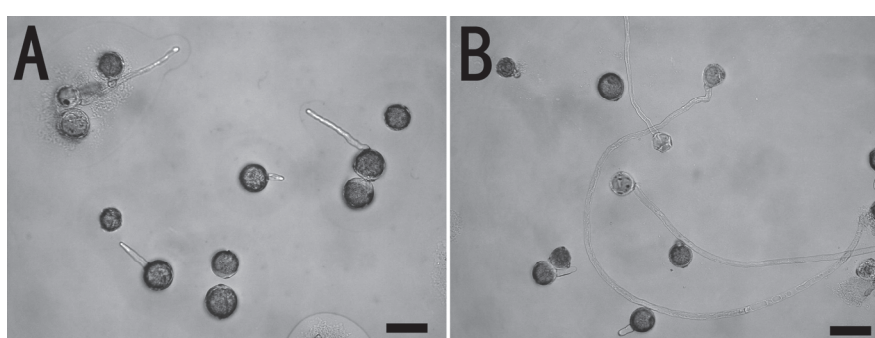
アルファベットは Tukey の多重比較により異なる文字間に 5%水準で有意差があることを示す



第1-4図 染色体倍加個体と交雑親品種の気孔の比較

A: ‘富有’ × ‘貴秋’ 倍加個体 (12x) B: ‘貴秋’ (6x)

バーは 50µm



第1-5図 染色体倍加個体と交雑親品種の花粉の比較

A: ‘富有’ × ‘甘秋’ 倍加個体 (12x) B: ‘甘秋’ (6x)

バーは 100µm

第1-2表 交雑実生の高接ぎ^z4年目における花蕾着生の有無

交雑組み合わせ	供試数	着生個体数
富有×甘秋(12x) ^y	5	1 (20) ^x
富有×貴秋(12x)	4	1 (25)
富有×甘秋(6x)	14	12 (86)
富有×貴秋(6x)	15	14 (93)

^z2007年に4年生富有に高接ぎ

^y () 内は倍数性を示す

^x () は供試数に対する割合 (%) を示す

第1-3表 染色体倍加個体と交雑親品種の花粉特性

交雑組み合わせ ・ 交雑親品種	花粉直径 (µm)	発芽率 (%)
富有×甘秋(12x) ^z	66.0a ^y	12.9b
富有×貴秋(12x)	64.4a	13.4b
甘秋(6x)	53.7b	36.7a
貴秋(6x)	50.9b	15.5b

^z () 内は倍数性を示す

^yアルファベットはTukeyの多重比較により、異なる文字間に5%水準で有意差があることを示す

1.4 考 察

カキにおける染色体倍加の事例としては、‘次郎’のプロトプラストにコルヒチン処理した十二倍体の作出が報告されている (Tamura ら, 1996) . また他に、‘駿河’と‘次郎’のプロトプラストを細胞融合して十二倍体を作出した事例 (Tamura ら, 1995) もあるが、いずれも再分化しやすい‘次郎’を材料として用いることが必要であり、適用できる品種が限定される。さらに、プロトプラストの取り扱いや細胞融合といった熟練を要する技術や特殊な装置を必要とする。また近年、‘藤原御所’は胚嚢の減数分裂異常を起こしやすく (Yamada・Tao, 2007) , 種子親に用いると後代に九倍体や十二倍体が高頻度で生じることが明らかにされている (田尾ら, 2003 ; Yamada・Tao, 2006) , しかし、このような特性を持つ品種はごく限られている。今回の試験では、供試したいずれの交雑組合せにおいても、比較的容易に染色体倍加個体を得ることができたことから、本手法を用いることでより多くの品種が倍数性育種に利用できるものと考えられた。

ほ場で新梢の茎頂部や腋芽にコルヒチン処理する方法では、樹種や品種によっては染色体倍加率が高くない場合もあり (八幡ら, 2004 ; 山根・栗原, 1980) , カキでも同様に低かった (千々和, 未発表) . この理由として、成長点が托葉と幼葉で包まれており、コルヒチンの浸透を妨げることや処理時の気温や新梢のステージを均一に揃えにくいことなどが考えられる (山根・栗原, 1980) . 一方、試験管内で培養・処理した場合にはコルヒチンの浸透性が高まり、低い濃度でも染色体倍加の効率が高くなる (Notsuka ら, 2000) . 今回の試験においても試験管内で培養・処理したため、効率的に染色体倍加ができたものと考えられる。今回、交雑組合せによりコルヒチン処理後の生存率に違いが見られたが、これは毛じの多少など成長点の形態や樹勢の違いによる可能性が考えられるが、この点については今後さらに交雑組合せを増やすなどして検討する必要がある。

‘次郎’の染色体倍加個体では生育が劣り、また四倍体ブドウ品種である‘巨峰’にコルヒチン処理した個体でも同様な傾向が見られており、これは同質倍加や高次倍数性による影響の可能性が考えられる (Notsuka ら, 2000 ; Tamura ら, 1996) . 本試験においても同様に、染色体倍加個体は生育が悪いものが多かったが、一部には生育良好なものも見られた。これは、供試した交雑実生が様々な樹勢に分離し、強い樹勢を示す個体もあったためと推察された。今回の試験では、十二倍体個体の樹勢の強弱を自根樹で判断し、生育が良好な系統の穂木を‘富有’に高接ぎしたが、接ぎ木後の生育は自根樹とほぼ同様の生育を示したことから、‘富有’への高接ぎが樹勢に及ぼす影響は小さいものと考えられた。葉面積や枝長には、倍数性による違いは見られなかったが、十二倍体個体の気孔密度は六倍体と比較して小さく、孔辺細胞が長いなど、‘次郎’での染色体倍加個体における観察結果 (Tamura ら, 1996) と同様の傾向を示した。

高接ぎに供試した十二倍体個体は、同じ交雑組合せで得られた六倍体個体と比較して花蕾の着生率が低いことから、キウイフルーツの高次倍数 (Ollitrault-Sammarcelli ら, 1994) と同様に花芽分化しにくい特性を持つものと推察された。しかし、これらは高接ぎ後も樹勢を維持しており、今後樹齢の進行に伴い

花蕾が着生する可能性もあるものと考えられる．一部の個体では高接ぎ後 4 年目で雌花や雄花の着生が見られ，完全甘ガキ果実を結実することが確認された．また，花粉に発芽能力があり，これを六倍体品種に人工受粉することで不完全種子を形成することが確認された．一方，十二倍体個体の雌花に六倍体品種の花粉を人工受粉しても種子は形成されなかったことから，九倍体の作出のためには十二倍体を花粉親とし，六倍体を種子親とすることが有効である可能性が示唆された．今回供試した材料は交雑実生であり，育種母本として用いるためには果実品質や栽培性などの特性を評価して選抜する必要がある．福井ら（1990）は，供試したカキ 139 品種中 102 品種が茎頂培養可能であることを報告している．今後，様々な品種由来の茎頂培養個体にこの手法を応用することができれば，より効率的な十二倍体の母本育成を進められるものと考えられる．

第2章 徒長枝切り返しによる雄花着生品種の結果母枝育成

2.1 緒言

前章では、十二倍体と六倍体間交雑により九倍体を作出するためには、六倍体を種子親に用い、花粉親に十二倍体を使用することが有効な方法であることが示唆された。

カキの育種を進めて行く上では、熟期や果実品質などに特徴のある品種を母本に選ぶことが重要である。たとえば‘西村早生’は、既存の主要品種の中では最も早生であり、また‘太秋’は大果で良食味といった果実形質を有しており、これらの品種は重要な育種母本となるものと考えられる。しかし、これらの六倍体品種はいずれも雄花を着生し、雌花が着生しにくくなるため、種子親として利用するに当たっては安定的な雌花着生技術を開発することが、育種の効率化を図る上で重要である。

‘太秋’など雄花を着生する品種では、結果母枝の長さや結果母枝内での発芽節位、前年度の花性などが雌花着生に影響しており、長さが40cm程度の充実した枝に雌花が多く着生することが知られている（千々和ら，1997；林ら，2001；西田・池田，1961；米森ら，1992）。主枝・亜主枝の背面や大きな側枝の剪除跡などから発生する不定芽由来の強勢な発育枝は、そのまま放置しておくとも8月以降まで伸長を続け、長さが1m以上の充実が悪い徒長枝となり、樹形の乱れや樹冠内部の日照や通風を阻害するため、通常の栽培管理では春季から夏季にかけてこれらを剪除する必要がある。一方、雌花のみを着生する‘富有’などでは、徒長枝を切り返し（高馬，1942）や捻枝（松村，1997）することで、翌年に花蕾が着生することが報告されており、徒長枝から結果母枝を育成できることが示されている。しかし、雄花を着生する品種では、徒長枝を利用した結果母枝の育成については検討されていない。

カキの花芽の雌雄性は7月中には区別でき、雄花の方が雌花よりも分化時期が早いとされている（Yonemoriら，1993）。また林ら（2000）も、‘西村早生’の雌花原基の分化・発育は雄花より遅いことを観察しており、長い発育枝や不定芽由来の発育枝など新梢の伸長が7月に停止する栄養条件下で雌花が分化しやすくなるとしている。

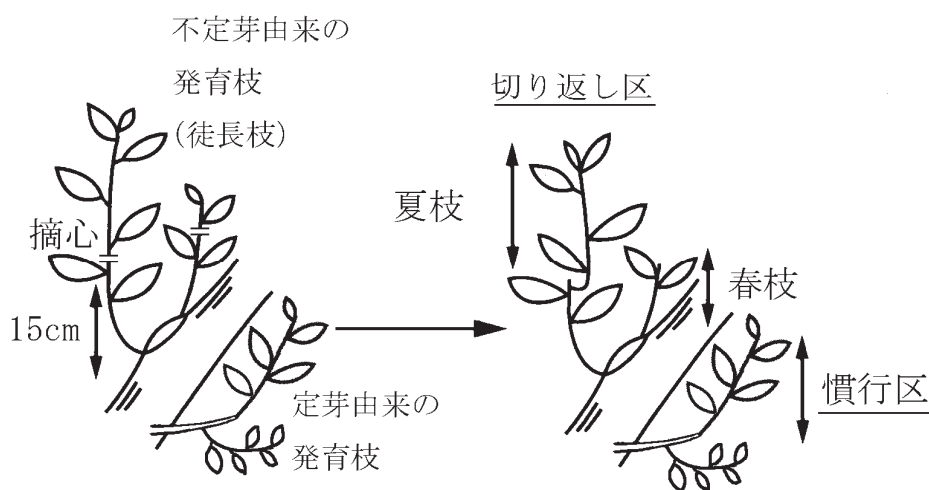
これらのことから、雄花を着生する品種に夏枝を発生させ、花芽分化期を遅れさせることができれば、雌花が多く着生するのではないかと考えられる。そこで本章では、雄花を多く着生する‘西村早生’を材料に、徒長枝を切り返しすることで夏枝の発生を促し、これに着生する花蕾の雌雄性ならびに獲得できる種子数を調査し、結果母枝としての利用の可能性を検討した。

2.2 材料および方法

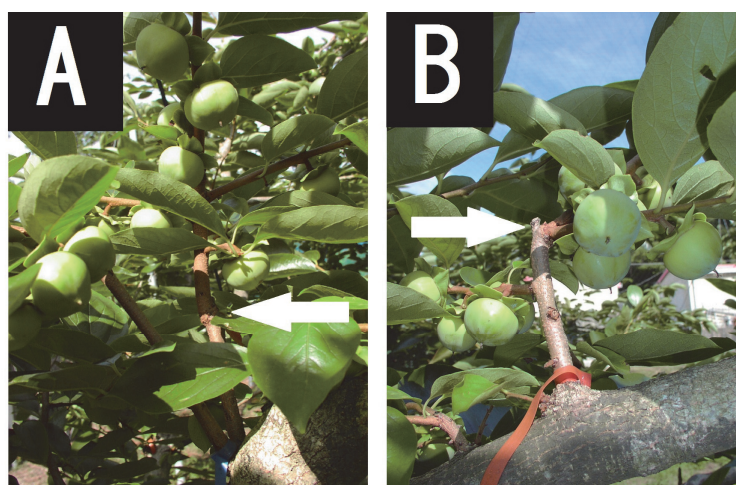
2.2.1 徒長枝切り返しが翌年の着花と獲得種子数に及ぼす影響

福岡県農業総合試験場に栽植された中庸な樹勢の20年生‘西村早生’3樹を供試し、2001年5月31日に、主枝の背面や側枝の剪除跡から発生した不定芽由来の発

育枝（以下，徒長枝と称す）を長さ約 15 cmで切り返しする切り返し区を設置した（第 2-1 図）。切り返し後に新梢が再伸長したものを夏枝，発生しなかったものを春枝とした。切り返し処理は各樹 8～10 本ずつ行い，1 区 1 樹 3 反復とした。落葉後に夏枝の発生率および枝長を調査した。また 2002 年 5 月上旬に，それぞれの区の枝長ならびに発芽節位ごとの花蕾数とその雌雄性を調査した。なお，雄花は花房単位で計数した。対照には，定芽由来で前年度に雄花を着生していない長さ約 30 cm の結果母枝（以下，慣行区と称す）を用いた。各区の枝を結果母枝として結果させ，8 月に摘果を行い，葉果比が 13～15 程度になるように結果量を調整した（第 2-2 図）。9 月 20 日に果実を収穫し，1 果当たり種子数を調査した。各試験区における雌花数および 1 果当たり種子数から結果母枝当たりの最大獲得種子数を推定した。調査にはそれぞれ 10 果を供試し，3 反復とした。



第 2-1 図 切り返し処理と枝の種類の模式図



第 2-2 図 切り返した徒長枝の翌年の結果状況
A:切り返し区夏枝 B:切り返し区春枝 (2002 年 7 月 3 日)
矢印は切り返し位置を示す

2.2.2 徒長枝切り返し時期の違いが翌年の着花と獲得種子数に及ぼす影響

2002年に中庸な樹勢の21年生‘西村早生’6樹を供試して5月10日、5月31日、6月15日にそれぞれ徒長枝を長さ約15cmで切り返し、前項と同様の調査を行った。2003年9月18日に、各処理時期別に果実を収穫し、1果当たり種子数を調査し、結果母枝当たりの最大獲得種子数を推定した。切り返し処理は各区8～10本、調査は各区10果を用い、いずれも3反復とした。

2.3 結 果

2.3.1 徒長枝切り返しが翌年の着花と獲得種子数に及ぼす影響

切り返し後の夏枝の発生率と長さおよび翌年の着花数を第2-1表に示した。夏枝の発生率は29.1%、枝長は37.5cmであった。慣行区における結果母枝当たり総雌花数は3.9個であったのに対し、切り返し区の夏枝では結果母枝当たり総雌花数が11.3個と有意に多くなった。一方、切り返し区の春枝では結果母枝当たり総雌花数が3.5個と慣行区と同程度であった。第2-3図に結果母枝の頂芽から第10芽までの節位別着花数を示した。慣行区には、頂芽から第4芽まで雌花が着生し、第5芽以降にはほとんど着生しなかった（第2-3図A）。一方、切り返し区の夏枝には頂芽から第9芽まで雌花が着生した。また、切り返し区の春枝では、慣行区と同様に頂芽から第4芽まで雌花が着生した。

雄花の着生は、慣行区では第2～4芽付近を中心に頂芽から第10芽まで見られ、結果母枝当たり総雄花数は32.9個であった（第2-3図B、第2-1表）。一方、切り返し区の夏枝では第4芽以降の下位節に雄花の着生がわずかに見られる程度で、結果母枝当たり総雄花数は1.3個と慣行区と比較して著しく少なかった。また、切り返し区の春枝には頂芽から第3芽までに雄花の着生が見られたが、結果母枝当たり総雄花数は0.6個で慣行区と比較して著しく少なかった。

雌花の開花期は、試験区間で違いは見られなかった（データ略）。また、1果当たり種子数は試験区間による差異は認められなかったが、最大獲得種子数は切り返し区で27.9個と慣行区の20.7個と比較して有意に多かった（第2-1表）。

第2-1表 ‘西村早生’の徒長枝切り返し処理^zが翌年の着花数および獲得種子数に及ぼす影響

試験区	夏枝発生率 (%)	結果母枝 の種類 ^y	枝長 (cm)	結果母枝当たり総着花数 ^x		1果当たり 種子数 (個)	最大獲得 種子数 ^v (個)
				雌花	雄花		
切り返し区	29.1	夏枝	37.5	11.3a	1.3b	4.7	27.9
		春枝	15.2	3.5b	0.6b	5.0	
慣行区		春枝	28.9	3.9b	32.9a	5.3	20.7
有意性 ^w			—	—	—	—	*

^z骨格枝から発生した徒長枝を、2001年5月31日に長さ約15cmで切り返した

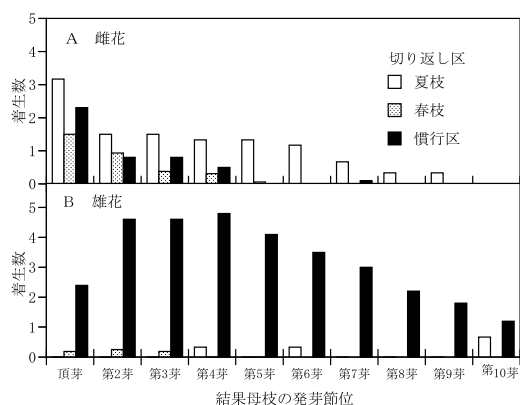
^y徒長枝切り返し後に再伸長したものを夏枝、夏枝が発生しなかったものを春枝、定芽由来で前年雄花を着生していない枝を慣行区とした

^x2002年5月に、各試験区の枝を結果母枝として着生した花蕾数を雌雄別に調査した

^v最大獲得種子数は1果当たり種子数および着生雌花数、夏枝発生率より算出した

^w*はt-検定により5%水準で有意差があることを示す

^uアルファベットはTukeyの多重比較により異なる文字間に5%水準で有意差があることを示す



第 2-3 図 ‘西村早生’ の徒長枝切り返し処理と節位別着花数

2001 年 5 月 31 日に徒長枝を長さ約 15cm で切り返し，2002 年 5 月に着花数を調査した

雄花は花房単位で計数した

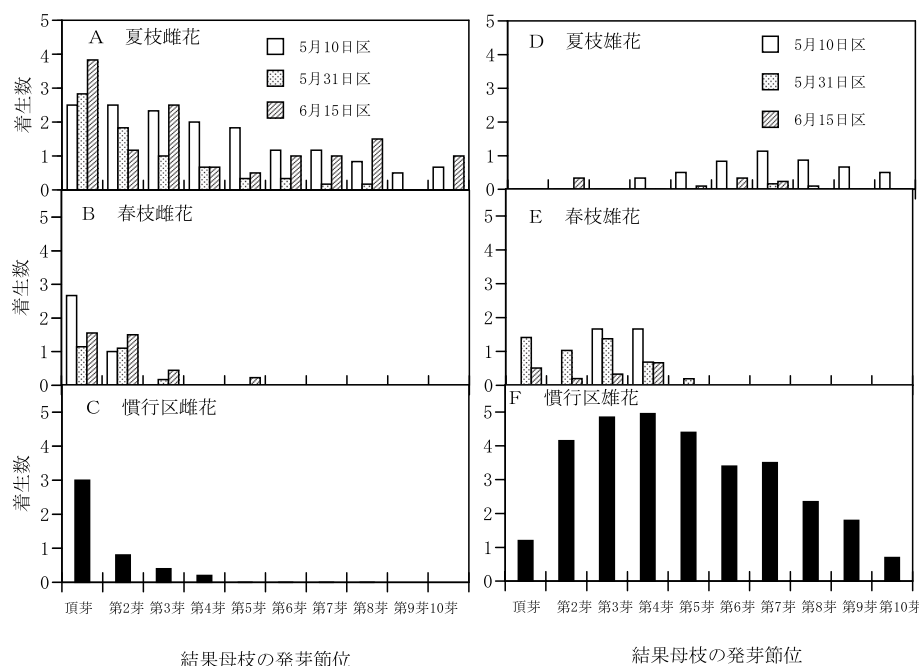
徒長枝切り返し後再伸長したものを夏枝，切り返し後に夏枝が発生しなかったものを春枝，定芽由来で前年に雄花を着生していない枝を慣行区とした

2. 3. 2 徒長枝切り返し時期の違いが翌年の着花と獲得種子数に及ぼす影響

第 2-2 表に切り返し時期別の夏枝の発生率と長さならびに翌年の着花数を示した．夏枝発生率は 5 月 10 日切り返し区で 57%，5 月 31 日切り返し区で 21%，6 月 15 日切り返し区では 27% となり，切り返し時期が 5 月下旬以降になると夏枝発生率は有意に低下した．また，夏枝長は 37.8～55.8 cm で，有意差はないものの，5 月 10 日切り返し区で最も長くなった．第 2-4 図に結果母枝の頂芽から第 10 芽までの節位別着花数を切り返し時期別に示した．いずれの切り返し処理区でも，夏枝には頂芽から第 10 芽付近まで雌花が着生し（第 2-4 図 A），結果母枝当たり総雌花数が 7.3～17.2 個と慣行区よりも多く着生した（第 2-2 表）．また，各切り返し処理区の春枝には頂芽から第 3 芽付近まで雌花が着生し（第 2-4 図 B），結果母枝当たり総雌花数は 2.4～3.7 個で，2002 年と同様に慣行区とほぼ同程度であった（第 2-4 図 C，第 2-2 表）．しかし，切り返し時期の違いが結果母枝当たり総雌花数に及ぼす影響は明らかではなかった．

結果母枝当たり総雄花数は，慣行区では 31.3 個であったのに対し，夏枝ではいずれの切り返し時期でも 0.3～5.3 個と著しく少なかった（第 2-2 表）．慣行区では 2002 年と同様に，第 2～5 芽付近を中心に頂芽から第 10 芽まで雄花が着生したのに対し（第 2-4 図 F），夏枝では第 7 芽付近を中心に第 4 芽から第 10 芽にかけて雄花が着生した（第 2-4 図 D）．また，春枝では，頂芽から第 4 芽付近まで雄花が着生したが（第 2-4 図 E），結果母枝当たり総雄花数は 1.7～4.9 個と慣行区よりも著しく少なかった（第 2-2 表）．

種子数についてみると，6 月 15 日切り返し区で 1 果当たり種子数がやや少なかったが，慣行区と比較して統計的に有意な差は見られなかった（第 2-2 表）．最大獲得種子数は，5 月 10 日切り返し区で 62.7 個と最も多く，次いで 6 月 15 日切り返し区で 41.6 個と，慣行区の 21.6 個と比較して多かった．一方，5 月 31 日切り返し区では，最大獲得種子数が 16.4 個と慣行区との間に有意な差は見られなかった．



第2-4図 ‘西村早生’の徒長枝切り返し時期の違いと節位別着花数

2002年に徒長枝を長さ約15cmで切り返し、2003年5月に着花数を調査した

雄花は花房単位で計数した

第2-2表 ‘西村早生’の徒長枝切り返し時期^zの違いが翌年の着花数および獲得種子数に及ぼす影響

試験区	夏枝発生率 (%)	結果母枝の 種類 ^y	枝長 (cm)	結果母枝当たり総着花数 ^x		1果当たり種 子数 (個)	最大獲得 種子数 ^w (個)
				雌花	雄花		
5月10日	57.0a ^v	夏枝	55.8	17.2a	5.3b	5.5a	62.7a
		春枝	16.6	3.7c	3.3b		
5月31日	20.8b	夏枝	38.0	7.3bc	0.3b	4.8ab	16.4c
		春枝	15.5	2.4c	4.9b		
6月15日	26.7b	夏枝	37.8	13.2ab	1.0b	3.9b	41.6b
		春枝	15.0	3.7c	1.7b		
慣行	—	慣行	32.2	4.4c	31.3a	4.9ab	21.6c

^z骨格枝から発生した徒長枝を、2002年に長さ約15cmで切り返した

^y徒長枝切り返し後に再伸長したものを夏枝、夏枝が発生しなかったものを春枝、定芽由来で前年雄花を着生していない枝を慣行区とした

^x2003年5月に、各試験区の枝を結果母枝として着生した花蕾数を雌雄別に調査した

^w最大獲得種子数は1果当たり種子数および着生雌花数、夏枝発生率より算出した

^vアルファベットはTukeyの多重比較により異なる文字間に5%水準で有意差があることを示す

2.4 考 察

カキの花芽分化期間は6月下旬から7月中旬とされてきたが（蜂巢，1930；西田・池田，1961；松原・川人，1938），林ら（2001）はこれよりも長く，6月中旬頃から始まり9月上旬頃まで続くことを報告している．また，長谷川ら（1991）は，6月下旬以降から8月初旬にかけて伸長した夏枝の先端から第5,6節位までの芽に多くの花芽を形成したことを報告しており，同様の現象は多く観察されている（蜂巢，1930；林ら，1998；高馬，1942）．本試験でも，‘西村早生’の徒長枝を切り返しした後に発生した夏枝に，翌年花蕾が多く着生することが確認できた．また，夏枝区では慣行区と比較して雌花が多く，雄花数が少なかった．Yonemori ら（1993）は，花芽の雌雄性は7月中には区別でき，雄花の分化発育は雌花より早いとしている．林ら（2001）も同様に，カキの雄花の原基は6月から7月にかけて花弁形成期に達するのに対し，雌花は8月下旬頃に花弁形成期に達することを観察している．本試験では，5月10日から6月15日に切り返しした後に発生した夏枝は6月中旬から8月上旬にかけて伸長したため，6月上旬頃までに伸長を停止する慣行区よりも花芽分化期が遅くなり，そのために，花芽分化期が早い雄花の分化は少なく，その後に分化する雌花が夏枝の下位節まで多く分化したものと推察された．今回の試験では花芽の分化・発育については調査していないが，本結果は新梢伸長の停止が遅れる栄養条件下で雌花が分化しやすくなるとする林ら（2000）の説を支持するものであった．

本試験における春枝区は，枝長が約15 cmと短いにもかかわらず，枝長約30 cmの慣行区と同程度の雌花が着生したが，雄花の着生は少なかった．‘西村早生’では，結果母枝の長さとは結果母枝当たり総雌花数には正の相関があり，15 cm程度の短い発育枝には頂芽から基部の腋芽まで雄花が着生し，雌花の着生は少ない（林ら，2000）．また，長い発育枝でも頂芽から第4芽付近までの上位節には雌花が着生するが，基部に近い下位節では雄花の着生しか見られない．こうした現象は，他のカキ品種でも確認されており，花性は頂芽優勢性の影響を受けていると考えられている（西田・池田，1961；米森ら，1992）．今回切り返しした節位は，本来であれば結果母枝の下位に位置するため雄花を着生するが，切り返し処理により頂芽となった節位の腋芽が花芽分化する際に，頂芽優勢性の影響を受けることで雌花を着生したものと推察された．また，カキにおいては栄養状態の優れた発育枝で雌花の着生が誘導されると考えられており（林ら，2001；西田・池田，1961；米山・脇坂，1957），切り返し後に夏枝が発生しなかった徒長枝は充実が促進され，栄養状態が優れると推察された．本試験では，春枝，夏枝ともに着花数には切り返し時期の違いによる差は見られなかったが，5月10日に切り返しを行った区で夏枝発生率が高くなったことから，雌花を多く確保するためには5月上旬に切り返しし，夏枝を多く発生させることがより望ましいと考えられた．

高馬（1942）は，‘富有’の徒長枝を切り返しして発生させた夏枝を結果母枝として利用できることを報告している．また，長谷川ら（1991）は，夏枝に結果した果実は，大きさがやや小さくなったものの，1果当たり種子数は春枝と夏枝で差がないことを報告している．本試験においても，6月15日切り返し区で果実の種子数

がやや少なくなったものの、慣行区と比較して統計的に有意な差は見られなかった。さらに、切り返し後に発生する夏枝には雌花が多く着生するため、結果母枝当たりの最大獲得種子数が多くなった。これらのことから、‘西村早生’の徒長枝を切り返しすることで、優良な結果母枝を育成することができ、効率的に種子獲得が出来ると考えられた。

以上、雌花の着生が不安定な品種である‘西村早生’の徒長枝を5～6月に切り返すことで、翌年の結果母枝として利用できることを明らかにした。特に、切り返し後に発生した夏枝では雌花の着生数が多くなった。本手法は、‘西村早生’と同様に雄花を多く着生する‘太秋’においても、雌花を多く着生させる方法として利用することが出来き、今後の十二倍体との交雑育種において、‘太秋’の種子親としての効率的利用につながるものと考えられる。

第3章 六倍体完全甘ガキ品種‘富有’と‘太秋’の交雑で生じた不完全種子の胚培養による九倍体作出

3.1 緒言

前章では、コルヒチンを利用した染色体倍加により、十二倍体完全甘ガキ系統を作出し、その花粉に稔性があることを明らかにし、九倍体育種のための母本となる可能性を示した。しかし、カキは幼若性が強い樹種であり、播種から開花・結実までに長年月を要する。そのため、十二倍体の中間母本を作出し、それから九倍体品種を育成するにはさらに長い年月が必要となる。

Sugiura ら (2000) は、六倍体品種である‘禪寺丸’の巨大花粉を分別して、同じく六倍体品種である‘次郎’に人工受粉した後、胚培養することにより九倍体作出することに成功している。しかしながら、この方法は溶液中での分別行程中に花粉発芽率の低下を招くため (Yamada・Tao, 2007) , ‘太秋’のような花粉発芽率の低い品種には適していない (千々和ら, 1997) 。

カンキツでは、二倍体間の交雑で生じた不完全種子から三倍体個体が得られることが明らかにされている (Esen・Soost, 1971 ; Oiyama・Okudai, 1983) 。Sugiura ら (2000) もまた、カキにおいて巨大花粉を使って生じた種子は不完全種子であったことを報告している。これらの種子の発育不全は、胚乳における母性および父性由来のゲノム比が 2:1 と不均衡であることが原因と考えられていることから (Bretagnolle・Thompson, 1995 ; Esen・Soost, 1971 ; Sanford, 1983) , 不完全種子の形成には倍数性変異が関与している可能性が考えられる。もし、カキの六倍体間交雑で得られた不完全種子についても倍数性変異と関連しているのであれば、六倍体間交雑で生じた不完全種子を利用することは、九倍体育種の材料として有用である可能性がある。

‘富有’は我が国における最も主要な完全甘ガキ品種であり、優れた果実品質と高い収量性を持っている (Itamura ら, 2005 ; Yamada, 1994) 。一方、‘太秋’は農林水産省果樹試験場で育成された完全甘ガキ品種であり、大果で極めて優れた食味を持っており (山根ら, 1995 ; Yamada, 2006) , これらは完全甘ガキ品種の育成のための母本として重要である。

本章では、これら優れた形質を持つ六倍体完全甘ガキ品種である‘富有’に‘太秋’を交雑して生じた不完全種子を胚培養することにより九倍体の作出を試みた。また、不完全種子から得られた九倍体の由来について検討した。

3.2 材料および方法

3.2.1 ‘富有’と‘太秋’の交雑により生じる不完全種子の発生

2001 年に‘富有’の雌花に袋を掛け、異花粉の混入を防止した後、巨大花粉を約 1%程度含む‘太秋’の花粉を受粉した。受粉 180 日後に果実 50 果を採取して、合計 166 個の種子を取り出し重さを測定した。それらのうち、種子の縦長が 13 mm 以下のものを不完全種子とした (第 3-1 図) 。

3.2.2 不完全種子の胚培養による植物体再生

2001～2002 年にかけて，‘富有’に巨大花粉を約 1%程度含む‘太秋’の花粉を受粉し，受粉 70～90 日後に果実を合計 303 果採取し，種子を無菌的に摘出した．不完全種子を半分に切り， $5\text{ }\mu\text{M}$ t-zeatin と $500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 酵母抽出物を添加した 1/2N MS 培地（Murashige・Skoog, 1962）で 16 時間日長， 25°C 条件下で培養した．2～3 か月培養後，得られた幼植物体をホルモンフリーの 1/2 N MS 培地に移した．茎頂や子葉に成長点のない植物体は， $10\text{ }\mu\text{M}$ t-zeatin と $1\text{ }\mu\text{M}$ IAA を含む 1/2 N MS 培地に暗黒条件下で培養しカルスを誘導した後，カルスを $10\text{ }\mu\text{M}$ t-zeatin と $1\text{ }\mu\text{M}$ IAA を含む 1/2 N MS 培地に移し，16 時間日長条件下で不定芽を形成させた．得られた不定芽は $5\text{ }\mu\text{M}$ t-zeatin を含む 1/2N MS 培地でシュートを伸長させ，2～3cm の長さに切り，切断面を 1.25 mM IBA に 30 秒浸漬した後，ホルモンフリーの 1/2N MS に置床し発根を促した（Tao ら，1988）．これらは 10 日間暗黒条件下で培養した後，16 時間日長条件下で培養を継続した．すべての培地は 3%ショ糖を含み pH 5.8 に調整した．発根した植物体はピートモス：バーミキュライト：ゼオライト（1:1:1）の培土に鉢上げし施設内で順化させた（Tao ら，1988）．



第 3-1 図 ‘富有’と‘太秋’との交雑で生じた完全種子と不完全種子の比較’
左：完全種子 右：不完全種子（縦長 13 mm 以下）

3.2.3 不完全種子由来植物体のフローサイトメトリーと染色体観察

不完全種子由来植物体の展葉 2～3 枚目の葉を採取し，葉片約 0.5 cm^2 に $400\text{ }\mu\text{L}$ の核単離溶液（Partec CyStain UV precise P Extraction Buffer）を加え，チョッピング法により核を遊離させた後， $50\text{ }\mu\text{m}$ のナイロンメッシュでろ過した．これに 1.6 mL の蛍光色素溶液（DAPI）を加えた後，プロイディアナライザー（Partec, PA 型）で蛍光強度を測定した．六倍体である‘富有’と九倍体である‘平核無’を基準として倍数性を推定した．また，根端を採取し， 2 mM 8-オキシキノリンに 5°C で 3～8 時間浸漬し，エタノール：酢酸（3：1）液で固定した．固定した根端を蒸留水で洗浄し，酵素液（4% Cellurase Onozuka RS (Yakult)，1% Pectolyase Y-23， 0.075 M KCl， 7.5 mM Na_2EDTA ，pH4.0）に 37°C で 1 時間インキュベートした後プレパラート上で細胞を拡散させ，水洗後 2%ギムザ液（ 0.1 M リン酸二ナトリウム， 0.1 M リン酸一ナトリウム，pH6.8）で染色して染色体を観察した（庄ら，1990）．

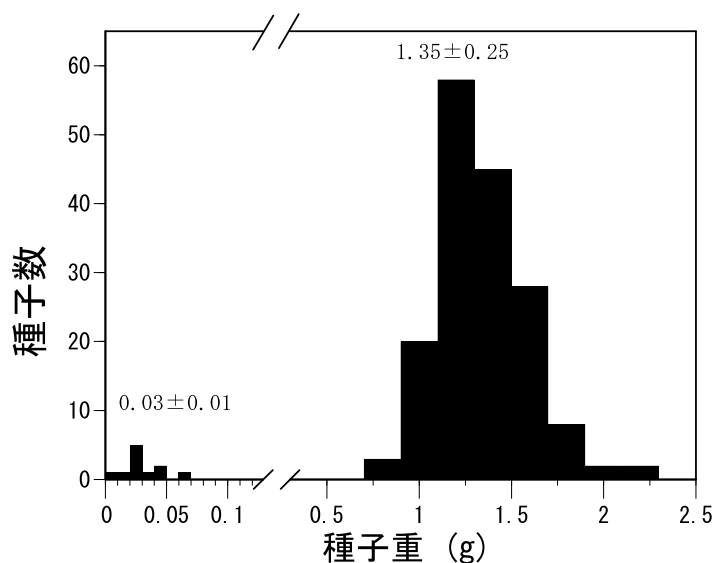
3.2.4 SSR マーカーによる親子鑑定

幼葉組織から CTAB 法 (Doyle・Doyle, 1987) により DNA を抽出した。交雑親である‘富有’ならびに‘太秋’と得られた 2 個体の九倍体実生の親子鑑定を行うため、4 種類の SSR マーカー、D. CT-13, 24, 61, 179 を用いて SSR 分析を行った (脇坂ら, 2003)。PCR 反応液は、20 μ L に 50 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 200 μ M dNTP, 0.5 μ M の蛍光標識 (NED) したプライマーセット, 0.5 μ g ゲノム DNA, 0.5 unit Taq polymerase (タカラバイオ社) とした。PCR 増幅産物は分離後 ABI310 シーケンサー (PE Applied Biosystems 社) を用いて検出した。増幅されたバンドの大きさは GeneScan software (PE Applied Biosystems 社) を用いて計算した。

3.3 結 果

3.3.1 ‘富有’と‘太秋’の交雑により生じる不完全種子の発生

種子重の分布を第 3-2 図に示した。種子には、種子重 0.75~2.3g に分布する主要な集団とは別に 0.0~0.07g に分布するマイナーな集団がみられた。長さ 13mm 以下の不完全種子はマイナーな集団に属していた。不完全種子の重さは平均 0.03g で完全種子 (1.35g) の約 1/40 であった。



第 3-2 図 ‘富有’と‘太秋’との交雑で生じた種子重の分布

種子は受粉 180 日後に採取した

図中の数字は平均重 $\pm$ 標準偏差を示す

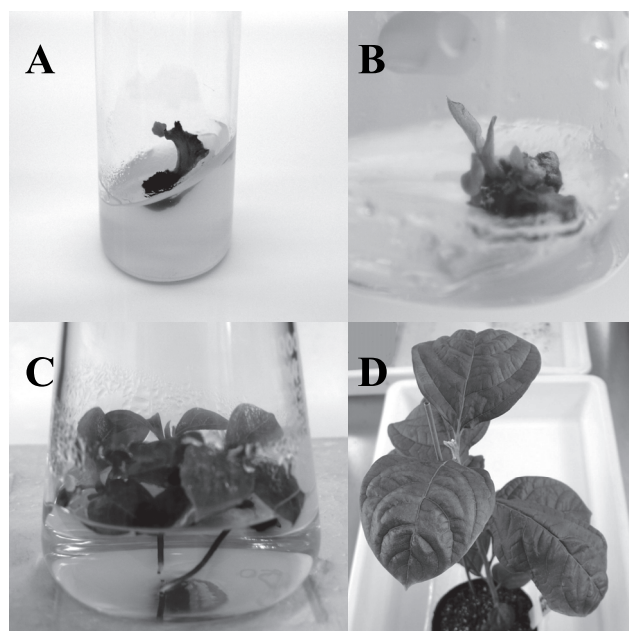
3.3.2 不完全種子の胚培養

合計 1078 個の種子のうち 6.3% に当たる 68 個の不完全種子が得られた (第 3-1 表)。68 個の不完全種子から 10 個の植物体 that 得られ、このうち 2 個体は子葉の片方を欠いており、茎頂と根端の成長点がない異常胚であった (第 3-3 図 A)。残りの 8 個体は正常胚であり完全な植物体となった。異常胚由来の 2 個体, No. 1 と No. 2

はカルスを経由して完全な植物体となり，施設内で旺盛な生育を示した（第 3-3 図 B-D）。

第3-1表 ‘富有’と‘太秋’の交雑により獲得した種子数および不完全種子由来の後代における倍数性

果実数	種子数(個)			不完全種子由来個体数		
	完全種子	子	合計	九倍体	六倍体	合計
303	1010	68	1078	2	8	10



第 3-3 図 不完全種子から生じた異常胚からの植物体再生

A:子葉の片方および頂芽・根端の成長点を欠損した植物体 B:カルスからの不定芽形成 C:シュートからの発根 D:鉢上げした再生個体

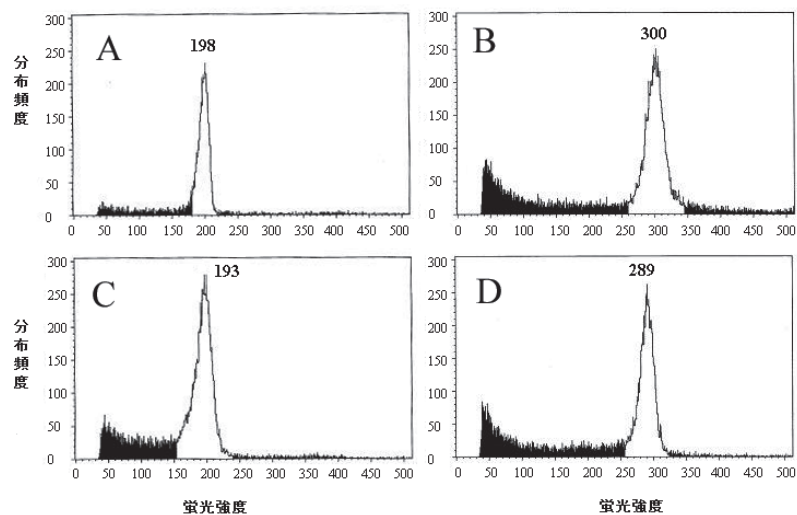
3.3.3. 得られた植物体のフローサイトメトリーと染色体観察

異常胚由来の 2 個体の相対 DNA 量は，九倍体と同等であった．一方，正常胚由来の個体の相対 DNA 量は六倍体と同等であった（第 3-4 図）．また，正常胚由来の個体の染色体数はすべて 90 本で六倍体であったのに対し，異常胚由来の 2 個体の染色体数は 135 本であり九倍体であることが確認された（第 3-5 図）．

3.3.4 SSR マーカーによる親子鑑定

4 種類の SSR マーカーで得られた，2 個体の九倍体（実生 No.1，実生 No.2）とその両親のアリルを第 3-2 表に示した．4 種類のうち 2 種類の SSR マーカーでは両親とその後代である 2 個体の九倍体ともに同一のアリルを持っていた（D. CT-13 で 163 bp，D. CT-24 で 116 bp）．残りの 2 種類の SSR マーカーでは両親とその後代で多型を示した．すなわち，‘富有’では D. CT-61 で 200 と 206 bp のアリルのみを持っていたのに対し，‘太秋’とその後代の九倍体である実生 No.1 と実生 No.2 では 200，

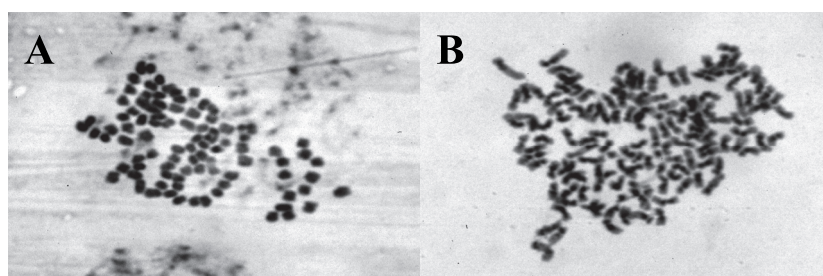
206 と 222 bp の 3 つアリルを持っていた。一方, D. CT-179 では‘太秋’と実生 No. 2 は 136 と 140 bp のアリルを欠き, また実生 No. 1 では 140 bp のアリルを欠いているのに対し, ‘富有’は 130, 136, 140, 151 と 162 bp の 5 種類のアリルを持っていた。また, 4 種類の SSR マーカーによる鑑定では, ‘富有’, ‘太秋’とその後代の親子関係に矛盾はなかった。



第 3-4 図 ‘富有’と‘太秋’との交雑で生じた不完全種子由来実生のフローサイトメトリー

A: ‘富有’六倍体 ($2n=6x=90$) B: ‘平核無’九倍体 ($2n=9x=135$) C:不完全種子由来の正常胚から生じた実生 D:不完全種子由来異常胚から生じた実生 (実生 No.1)

図中の数字は蛍光強度のピーク値を示す



第 3-5 図 ‘富有’と‘太秋’との交雑で生じた不完全種子由来実生の染色体

A: 不完全種子由来の正常胚 から生じた実生 ($2n=6x=90$) B:不完全種子由来の異常胚から生じた実生 No.2 ($2n=9x=135$)

第3-2表 4種類のSSRマーカーにおける九倍体実生と両親のアリル

親品種および 後代	SSRマーカー			
	D.CT-13	D.CT-24	D.CT-61	D.CT-179
富有	163 ^z	116	200/206	130/136B/140B/151/162
太秋	163	116	200/206/222A ^z	130/151/162
実生 No.1	163	116	200/206/222A	130/136B/151/162
実生 No.2	163	116	200/206/222A	130/151/162

^z数値はbpを示す

^yAとBはそれぞれ‘太秋’と‘富有’に特異的なアリルであることを示す

3.4 考 察

不完全種子の重さの分布は完全種子のそれとは明らかに異なった。カンキツでは不完全種子から三倍体などの倍数性変異体が得られており、これらは完全種子の1/6～1/3と大きさで明確に区別できる（Esen・Soost, 1971；Oiyama・Okudai, 1983）。今回の試験でも同様に、六倍体間交雑で生じた不完全種子から九倍体個体を得られることが明らかとなった。不完全種子から得られた九倍体個体は成長点がなかったため、カルスを経由した再分化が必要となった。六倍体の巨大花粉を受粉して得られた胚も同様に、子葉のない異常胚であったことから（Sugiura ら, 2000）、不完全種子から生じる倍数性変異を伴う胚は、生育異常を起こしやすい、途中で生育を停止しやすいなどの傾向があるものと考えられた。一方、不完全種子から生じた六倍体個体は、カルスを経ることなく正常に成長した。これら六倍体を生じた不完全種子が生育初期に種子の生育を停止した理由は不明だが、胚の分化は正常に行われるものと考えられた。異常胚から得られたこれら九倍体2個体は、鉢上げ後には旺盛に生育した。この樹勢の強さは、三倍性に由来するものと考えられる（Sanford, 1983）。

本試験で得られた不完全種子由来の九倍体個体は、いずれも両親由来のアリルを持っていることから、無性生殖ではなく有性生殖であることが明らかとなった。非還元性配偶子には雌性側と雄性側の両方があることが多くの植物種で観察されている（Bretagnolle・Thompson, 1995；Ramanna・Jacobsen, 2003）。さらに非還元配偶子には減数分裂第一期（FDR）と減数分裂第二期（SDR）ならびに減数分裂後に起こるもの（PMR）が存在する（Bretagnolle・Thompson, 1995；Ramanna・Jacobsen, 2003）。本試験では4種類のSSRマーカーしか使用していないため、どの型の非還元配偶子が生じたのか不明であるが、実生1、実生2ともD.CT-179において種子親である‘富有’に特有の136あるいは140bpいずれかのアリルを持っていないことから、雌性配偶子の減数分裂第一期に異常が起こったものではなかった。これら2個体の九倍体の実生は、花粉親である‘太秋’特有のアリルであるD.CT-61における222bpのアリルを持っていることから、還元雌性配偶子と非還元雄性配偶子の受精により生じたものと考えられた。カキにおける非還元雄性配偶子はFDRタイプであると考えられていることから（庄, 1990；山田, 2007）、本試験において生じた非還元雄性配偶子もFDRタイプであると推察されるが、この点を明らかにするためには、さらに多くのSSRマーカー分析が必要である。

カキは、自然状態においても非還元花粉が品種により様々な頻度で形成されている（Sugiura ら，2000）．しかし，‘太秋’は非還元花粉の発生頻度，花粉の収量ならびに発芽率が低いため（千々和ら，1997），‘太秋’を花粉親に用いた場合には，等張液中で分別して人工受粉する Sugiura ら（2000）の方法を用いることは困難と思われる．本試験では，六倍体品種間の通常の人工受粉で生じた不完全種子から九倍体を得られることを示した．この結果は，六倍体間交雑で生じる不完全種子が，九倍体作出のための有用な材料となることを示唆している．山田ら（2003）は，非還元花粉は開花前の低温により増加することを報告している．今後，‘太秋’のような非還元花粉の発生頻度が低い品種において，人為的に非還元花粉を誘導することができれば，効率的な倍数性育種が可能になるものと思われる．

第4章 無核性完全甘ガキ品種‘福岡 K1 号’の育成ならびにジベレリン散布と摘蕾による結実安定効果

4.1 緒 言

カキの結実性は、開花後の日照時間、樹勢や樹齢の他、品種特性である種子の形成力や単為結果性に影響されることが知られており、六倍体完全甘ガキ品種である‘富有’や‘伊豆’などは単為結果力が弱く、結実安定のために受粉を行い、種子を形成させる必要がある（広瀬ら，1971；梶浦，1943；永沢ら，1968；山田ら，1987；矢野ら，1999）。一方，‘平核無’や‘刀根早生’などの無核性品種は九倍体であり，単為結果性と胚の成長が途中で停止する偽単為結果性を併せ持つため（傍島ら，1975；庄ら，1990，1992），無核果実生産が比較的容易である。しかしながら，これらの無核性品種はいずれも渋ガキであるため，脱渋の不要な無核性完全甘ガキ品種の育成が求められている。日本原産のカキにおいては，完全甘ガキは非完全甘ガキに対して遺伝的に劣性であるため，1 回の交雑で完全甘ガキを得るためには，完全甘ガキ同士の交雑を行う必要がある（池田ら，1985）。前章では，六倍体完全甘ガキ間の交雑で生じた不完全種子から九倍体を得られることを明らかにした。本章では，不完全種子から得られた九倍体系統から果実品質の優れる無核性完全甘ガキ品種‘福岡 K1 号’（商標名：秋王）を育成した。

無核性のカキ品種の普及拡大には安定して結実することが重要であり，単為結果性や偽単為結果性の特性を把握しておく必要がある。

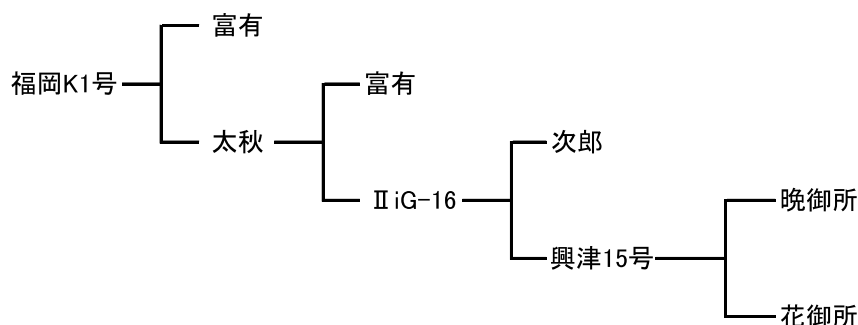
植物成長調節剤であるジベレリンには，‘富有’や‘伊豆’などの無受粉果実の落果を抑制する作用があることが確認されている（林ら，1996；傍島ら，1969；Yamamura ら，1989）。ジベレリンは，50～200ppm の濃度で満開 10 日後に果実へ散布すると落果防止効果があるとしてカキの全品種を対象に 2012 年に農薬登録された（登録番号：第 6004～6007 号）。一方，摘蕾には果実間の養分競合を軽減し，結実率を向上させる効果があることが知られている（文室，2003；堀江ら，1988）。

本章では，筆者らが育成した無核性完全甘ガキ品種‘福岡 K1 号’の生育特性ならびに果実品質特性について報告するとともに，早期落果の特徴を明らかにした。併せて，ジベレリン散布ならびに摘蕾が結実に及ぼす影響について検討した。

4.2 材料および方法

4.2.1 カキ‘福岡 K1 号’の育成経過

2001 年に，‘富有’と‘太秋’の交雑組合せで生じた不完全種子を胚培養して九倍体実生を作出した（Chijiwa ら，2008）。得られた実生の休眠枝を 2007 年 3 月に 5 年生の‘富有’に高接ぎし，結実を促進した。2008 年に初結実となり特性検定を開始した。そのうちの 1 系統の果実品質が優れることが認められたため，2010 年 11 月に種苗法に基づく品種登録を出願し，2012 年 4 月に品種登録された（登録番号：第 21792 号）。‘福岡 K1 号’の来歴は第 4-1 図に示すとおりである。



第 4-1 図 ‘福岡 K1 号’ の来歴

4.2.2 カキ ‘福岡 K1 号’ の生育および果実品質特性

2008～2010 年に生育ならびに果実品質の特性をカキの育成系統適応性検定試験・特性検定試験調査方法（農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所，2007）に準じて行った．生育特性では発芽期，開花盛期，花の着生程度，収穫期，樹勢および樹姿を調査した．発芽期は，結果母枝の先端 2～3 芽が 20～30%展葉した日，開花盛期は全花蕾の 80%が開花した日とした．‘富有’および‘太秋’では 1 結果枝 1 蕾となるように摘蕾し，7 月中旬に葉果比 20 となるように摘果した．‘福岡 K1 号’では摘蕾せずに結実させた後，7 月末に葉果比 20 となるように摘果した．いずれの年次においても灌水は行わなかった．

果実赤道部の果皮色がカラーチャート値で 5 以上（‘太秋’では 4 以上）となったものを成熟期に達したと判断して収穫した．収穫期は，全果実の 20%を収穫した日を始期，50%以上を収穫した日を盛期，100%を収穫した日を終期とした．収穫果実品質特性としては，果重，果皮色，果肉硬度，肉質の粗密，果汁の多少，糖度，渋味の有無および種子数を調査した．果実糖度は，果肉を果頂部からへた部にかけてくさび状に切り取り，ハンドジュースで搾った果汁を屈折糖度計で測定した．果肉硬度は，円筒形プランジャーを装着したユニバーサル式硬度計で測定した．併せて，果実の障害として，条紋ならびにへたすきの発生程度を，無（0），微（1），小（2），大（3）の 4 階級に指数化し，平均値で示した．果実品質調査には 1 回につき 5～10 果を供試した．対照として交雑親である‘富有’および‘太秋’を用いた．

4.2.3 カキ ‘福岡 K1 号’ の早期落果の特徴

2011 年に高接ぎ 5 年生‘福岡 K1 号’（中間台木：9 年生‘富有’）および対照として同じく九倍体品種の‘刀根早生’（30 年生）を供試した．両品種とも摘蕾を行わず，全ての花に増量剤（商品名：マリッジパウダー，三共包材）で 5 倍に希釈した‘禅寺丸’の花粉を人工受粉した．満開後から早期落果が終了する 7 月下旬にかけて 1 週間ごとに落果率を調査した．試験は側枝単位とし，側枝当たり約 100 果についての調査を 3 反復で行った．また，2012 年には早期落果終了後に当たる 8 月 1 日に結実している果実をそれぞれ 40～50 果程度採取し，果実中に含まれる不完全種子数を調査した．

4.2.4 ジベレリン散布および摘蕾がカキ‘福岡 K1 号’の結実に及ぼす影響

2011 年に高接ぎ 5 年生‘福岡 K1 号’（中間台木：9 年生‘富有’）を供試し、無摘蕾の状態で結実させた果実に対し満開 10 日後の 6 月 8 日にジベレリン 200 ppm 溶液を散布する区と対照として無散布区を設置した。試験は側枝単位とし、側枝当たり約 100 果についての処理を 4 反復で行い、早期落果終了後の 7 月 30 日に落果率を調査した。10 月中旬～11 月上旬にかけて各試験区から果実を 10 果ずつ採取し、果実品質を前項に準じて調査した。また、2012 年にはジベレリン散布と摘蕾を組み合わせる試験を実施した。ジベレリン処理は満開 10 日後の 6 月 1 日に 200 ppm の濃度で果実へ散布した。摘蕾は原則として 1 新梢につき 1 蕾となるように実施したが、30 cm 以上の新梢には 2 蕾着生させ、5 cm 以下の新梢の蕾はすべて取り除いた。試験は側枝単位とし、約 50 果についての落果率の調査を 4 反復で行った。また、早期落果終了時における結実量の指標として、花蕾が着生した新梢に占める、結果した新梢の割合を結果枝率として示した。なお、園内には‘禅寺丸’が受粉樹として栽植されており、いずれの年次も訪花昆虫による自然受粉が行われる環境条件であった。

4.3 結 果

4.3.1 カキ‘福岡 K1 号’の生育および果実品質特性

‘福岡 K1 号’の生育特性を第 4-1 表に示した。発芽期は 3 月 17 日、開花盛期は 5 月 22 日で‘富有’とほぼ同時期であった。雌花の着生は、‘富有’よりやや少なく、‘太秋’より多かった。また、雄花の着生がごくわずかに見られることがあった。樹勢はやや強く、樹姿は開張性であった。‘福岡 K1 号’の果実外観を第 4-2 図に、また果実品質特性を第 4-2 表に示した。果重は 365 g で‘太秋’と同程度で、‘富有’より大きかった。果実糖度は 19.6°，果肉硬度は 1.3 kg で‘富有’より軟らかく、肉質は粗で果汁が多く、食味は‘太秋’に似ていた。種子と渋味はなく、無核性の完全甘ガキであった。条紋の発生はほとんど見られなかったが、‘太秋’と同程度のへたすきが見られた。



第 4-2 図 ‘福岡 K1 号’の果実外観

第4-1表 ‘福岡K1号’の生育特性（2008～2010年）

品 種	発芽期 (月/日)	開花 ^z 盛期 (月/日)	収穫期 ^y (月/日)			樹勢	樹姿	雌花の着 生程度	雄花の着 生程度
			始期	盛期	終期				
福岡K1号	3/17	5/22	10/17	10/25	11/12	やや強	開張	多	少
太 秋	3/16	5/19	10/18	10/25	11/5	中	立	中	中
富 有	3/17	5/21	11/11	11/21	12/1	強	開張	多	無

^z80%の花が開花した日^y収穫期は始期は20%，盛期は50%以上を収穫した日，終期は最後の収穫日

第4-2表 ‘福岡K1号’の果実品質特性

品 種	果重 (g)	果皮色 ^z	糖度 (°Brix)	硬度 ^y (kg)	肉質の 粗密	果汁の 多少	渋味の 有無	種子数 (個)	条紋 ^x	へたすき ^x
福岡K1号	365a ^w	5.3a ^w	19.6a ^w	1.3b ^w	粗	多	なし	0.0c ^v	0.0	1.4a ^w
太 秋	394a	4.3b	16.1b	1.2b	粗	多	なし	2.1b	0.5	1.5a
富 有	287b	5.5a	16.4b	2.0a	中	中	なし	4.7a	0.0	0.5b

^z果皮色は赤道部をカキ用カラーチャートで測定した^y硬度は円筒形プランジャーを装着したユニバーサル式硬度計で測定した^x条紋ならびにへたすきは0（無）～3（大）で評価し，平均値で示した^wアルファベットは，異なる文字間でTukeyの多重検定により5%水準で有意差があることを示す^vアルファベットは，異なる文字間でSteel-Dwassの多重検定により5%水準で有意差があることを示す

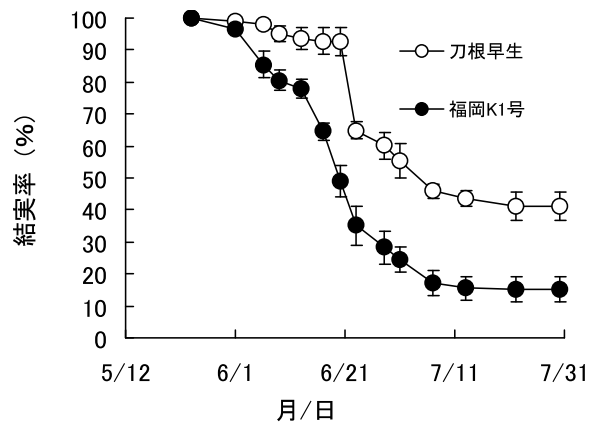
4.3.2 カキ‘福岡 K1 号’の早期落果の特徴

2011 年における‘福岡 K1 号’ならびに‘刀根早生’の結実率の推移を第 4-3 図に示した．‘刀根早生’では，満開 30 日後に当たる 6 月 20 日までは落果が少なかったが，それ以降落果が多くなった．一方，‘福岡 K1 号’では，満開 20 日後に当たる 6 月 13 日以降に落果が多くなり，‘刀根早生’よりも落果開始時期が早かった．また，最終的な結実率は，‘刀根早生’では 41.2%であったのに対し，‘福岡 K1 号’では 15.1%と低かった．

‘刀根早生’では，果実中の不完全種子数は 4～7 個のものが多く，平均 5.7 個であったのに対し，‘福岡 K1 号’では果実中の不完全種子数は 0～2 個のものが多く，平均 0.9 個であった（第 4-4，5 図）．

4.3.3 ジベレリン散布および摘蕾がカキ‘福岡 K1 号’の結実に及ぼす影響

2011 年におけるジベレリン無散布区の結実率は 13.0%となった．一方，ジベレリン 200 ppm 区の結実率は 49.6%と有意に高かった（データ略）．2012 年における早期落果終了後の結実率ならびに結果枝率を第 4-3 表に示した．前年同様，ジベレリン散布により結実率が有意に高まり，また摘蕾でも結実率が有意に高まった．ジベレリン散布と摘蕾の交互作用は認められなかったが，これらを組み合わせることで結実率が 65.9%，結果枝率は 72.1%となった．いずれの年次とも果実品質には試験区間で統計的に有意な差はなかった（データ略）．



第 4-3 図 ‘福岡 K1 号’ および ‘刀根早生’ の結実率の推移
 調査年次は 2011 年
 垂線は標準誤差を示す

第4-3表 ジベレリン処理ならびに摘蕾が‘福岡K1号’の結実に及ぼす影響

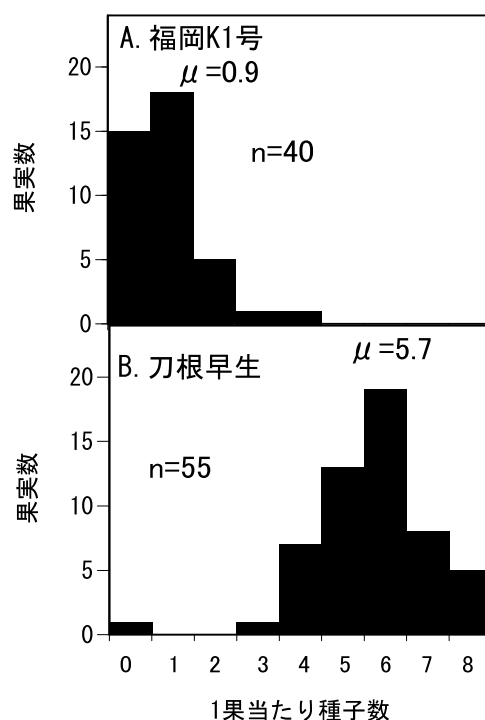
ジベレリン処理	摘蕾	結果母枝長 (cm)	結実率 (%)	結果枝率 ² (%)
あり	あり	28.9	65.9	72.1
あり	なし	28.8	38.5	60.0
なし	あり	31.4	23.5	34.2
なし	なし	32.8	11.7	19.4
ジベレリン処理		—	** ¹	**
摘蕾		—	**	*
ジベレリン処理×摘蕾		—	N.S.	N.S.

²花蕾を着生した新梢に占める早期落果終了後の結果した新梢の割合

¹**および*は、分散分析によりそれぞれ1%および5%水準で有意差あり、N.S.は有意差なし



第 4-4 図 ‘福岡 K1 号’ および ‘刀根早生’ の幼果中の種子の比較
 上：‘福岡 K1 号’，下：‘刀根早生’



第 4-5 図 ‘福岡 K1 号’ および ‘刀根早生’ の 1 果当たり不完全種子数の分布
n は調査果実数, μ は平均値を示す

4.4 考 察

九倍体のカキ品種には, ‘平核無’やその枝変わり品種である ‘刀根早生’の他, ‘宮崎無核’や ‘渡沢’などがあり, これらはいずれも無核性である(庄ら, 1992). しかしながら, これらはいずれも偶発実生の渋ガキ品種であり, 人為的に作出した九倍体品種の種子の有無についての報告は見当たらない. 今回 ‘富有’に ‘太秋’を受粉して育成した九倍体品種 ‘福岡 K1 号’においても, 既存の九倍体品種と同様に無核性であることが確認された. また, 六倍体完全甘ガキ間の交雑では, 後代に完全甘ガキのみが出現するが(池田ら, 1985), 倍数性変異により九倍体の後代が生じた場合にも完全甘ガキとなることが明らかとなった. 果皮色や樹勢は両親の中間値を示した. 果実糖度は両親よりも高く, 肉質は粗で軟らかく, 花粉親である ‘太秋’と極めてよく似ており, 食味は良好であった.

‘福岡 K1 号’の結実率は, 同じ九倍体品種である ‘刀根早生’と比較して低く, 単為結果力は弱いと考えられた. ‘平核無’や ‘刀根早生’では, 人工受粉により結実性が向上することが知られており, これらの品種が受精後に途中で種子の生育が停止する偽単為結果性を持つためと考えられている(文室, 2003; 傍島ら, 1969, 1975). しかし, ‘福岡 K1 号’に人工受粉を行っても果実中の不完全種子数が ‘刀根早生’と比較して著しく少なかった. これらのことから, ‘刀根早生’の胚珠には受精能力があるのに対し, ‘福岡 K1 号’では胚珠の受精能力が著しく低いた

め、偽単為結果性を誘起できないことが結実率の低い原因のひとつと推察された。

カキでは果実へのジベレリン散布が早期落果防止に効果があることが知られている（Yamamura ら,1989）。しかし，‘富有’などの有核性品種では，‘平核無’などの無核性品種と比較してジベレリンの効果が不安定であり，特に同一樹内に有核果と無核果が混在するとその傾向が強くなる。これは，有核果と無核果における果実間の同化養分の競合が生じるためと考えられている（Kitajima ら，1992）。また，早期落果の多い‘伊豆’や‘刀根早生’などの品種に摘蕾や早めの摘果を行うと，結実率が高まることが知られており，これは果実間の同化養分の競合が緩和されるためと考えられている（文室，2003；堀江ら，1988）。‘福岡 K1 号’においてもジベレリンを果実に散布することで結実率や結果枝率が無散布区と比較して有意に高くなった。また，摘蕾でも同様に結実率と結果枝率が有意に高くなった。ジベレリン散布と摘蕾に交互作用は認められなかったが，これらを組み合わせることで結実率ならびに結果枝率を無散布・無摘蕾と比較して大幅に向上させることができた。

‘福岡 K1 号’は受精能力が低いことから，有核果と無核果における果実間の同化養分の競合が生じないため，ジベレリンの効果が安定しやすく，これに摘蕾を組み合わせることにより，果実間の同化養分の競合がさらに起こりにくくなるものと考えられた。また，満開 10 日後の果実へのジベレリン散布は果実品質に影響を及ぼさないことから，これらは‘福岡 K1 号’の結実安定に有効と考えられた。その他に樹齢や樹勢もカキの早期落果に影響を及ぼすことが知られており，枝葉と果実間の同化養分の競合が原因のひとつと考えられる（北島ら，1990）。従って，樹勢がやや強い‘福岡 K1 号’の結実安定には樹冠拡大や肥培管理などによる樹勢の制御も有効と考えられる。

以上，‘富有’と‘太秋’の交雑組合せで得られた不完全種子を培養してカキ新品種‘福岡 K1 号’を育成した。本品種は無核性の九倍体完全甘ガキ品種であり，成熟期は‘太秋’とほぼ同時期で，大果・良食味であった。単為結果力ならびに偽単為結果力とも強くなく，若樹齢樹では結実性が不安定であり，結実を安定させるためにはジベレリン散布と摘蕾を組み合わせることが有効であることが明らかとなった。今後，樹齢の経過や樹勢が結実に及ぼす影響を明らかにするとともに，省力的に結実を安定させる栽培法の確立が必要である。

第5章 九倍体花粉の受粉がカキ‘富有’の結実ならびに果実品質に及ぼす影響

5.1 緒 言

前章まででは、著者は無核性である九倍体品種の育成について検討を行った。しかしながら、カキの新品種の育成や成園化までには長い年数を要する。もし、既存品種の無核化が可能になれば、品種育成や栽植後の成園化までにかかる年数を必要とせずに、無核性果実の生産が可能となる。本章においては、我が国における主要な完全甘ガキ品種である‘富有’の無核果実生産について検討した。

六倍体カキである‘富有’は単為結果力が弱く、安定生産のためには受粉を行い、種子を形成させる必要がある（梶浦，1943；永沢ら，1968）。一方，‘平核無’や‘刀根早生’などの九倍体カキ品種はいずれも無核性であり（庄ら，1990, 1992），食べやすく消費者の嗜好性に適合した果実品質特性を有している。これらの品種は、六倍体受粉樹の花粉との受精後に胚の成長が途中で停止する偽単為結果性を示す（傍島ら，1975）。逆に、六倍体品種に九倍体の花粉を受粉することで偽単為結果を誘起することができれば，‘富有’などの既存品種の無核果実を安定的に生産できる可能性がある。しかしながら，これまでカキには九倍体品種で雄花を着生するものが存在しなかったため，九倍体の花粉が六倍体品種と受精した場合における，結実性および果実品質に関する研究は行われてこなかった。近年，Sugiura ら（2000）は‘次郎’に‘禅寺丸’の非還元花粉を受粉することで九倍体実生の作出に成功している。そこで，今回これら九倍体実生の中から，雄花を着生する系統を選抜して，その花粉を‘富有’に受粉し，結実ならびに果実品質に及ぼす影響について調査した。

5.2 材料および方法

5.2.1 九倍体系統の花粉特性

‘次郎’に‘禅寺丸’の非還元花粉を受粉して作出した九倍体（Sugiura ら，2000）のうち，雄花の着生数が比較的多い系統‘2B105-1’ならびに‘2B62-2’を供試した。2009年に長さ20～30cmの結果母枝を無作為に選び，花房単位で結果母枝当たりの雄花着生数を計数した。また，2009および2010年にこれらの花粉を採取し，花粉量と発芽率を調査した。花粉量は開花直後の花蕾約50個を20℃で1日乾燥した後，指で揉み出して集めて計量した。発芽率は，15%ショ糖を含む1%寒天培地に花粉を置床して，25℃の温度条件下で3時間後に約150粒について調査した。対照に受粉樹として一般的に用いられている六倍体の‘禅寺丸’ならびに‘赤柿’の花粉を用いて比較した。また，同培地上で発芽前の‘2B62-2’ならびに‘禅寺丸’の花粉を写真撮影し，約100粒についてその直径について画像解析ソフトを用いて測定した。

5.2.2 九倍体花粉の受粉が‘富有’の結実ならび種子の発育に及ぼす影響

2009および2010年に30年生‘富有’を3樹供試し，1樹内にそれぞれ以下の3

つの区を3反復で設置した。すなわち、開花前に約150個の雌花に袋かけし、満開期(全体の8割が開花した時期)に除袋し、40～50花に‘2B62-2’の花粉を増量剤(商品名:マリッジパウダー、三共包材)で3倍に希釈して人工受粉後に再被覆したものを九倍体花粉区とした。残りの袋かけをしたまま受粉させなかったものを花粉遮断区とした。また、袋かけせずに自然受粉させたものを六倍体花粉区(受粉樹は‘禅寺丸’)とした。2010年の満開期に各区からそれぞれ30花ずつを無作為に選んでタグを付け、満開18日後の6月11日～満開58日後の7月21日まで結実率を調査した。また、2009年には満開1か月後の6月22日～成熟期の11月16日まで1か月ごとに六倍体花粉区および九倍体花粉区から果実をそれぞれ3～6果程度採取し、種子を取り出して長さを測定した。

5.2.3 九倍体花粉の受粉が‘富有’の果実品質に及ぼす影響

2009年11月16日ならびに2010年11月25日に試験2で設置した試験区から果実を収穫し、果重、果皮色、糖度、果肉硬度および種子数を調査した。果皮色は赤道部をカキ(全般)用カラーチャートで測定した。果実糖度は、果肉をくさび状に切り取り、ハンドジュースで搾った果汁を屈折糖度計で測定した。果肉硬度は、円筒形プランジャーを装着したユニバーサル式硬度計で赤道部を測定した。果実品質調査には各区10果を供試し、3反復とした。また、各区の果実から種子を取り出し種子の長さ・重さを測定した。さらに対照として、自然受粉させた‘平無核’の成熟果からも不完全種子を測定した。なお本試験では、種子の長さが17 mm未満または、重さ0.7 g未満のものを不完全種子とした。

5.3 結 果

5.3.1 九倍体系統の花粉特性

九倍体系統と六倍体受粉樹の雄花着生数、花粉量ならびに発芽率を第5-1表に示した。雄花着生数は‘2B62-2’で14.7個、‘2B105-1’では10.3個と、いずれも‘禅寺丸’の34.3個より少なかった。また、1花当たり花粉量は、‘2B62-2’で4.24 mg、また‘2B105-1’では3.70 mgと、いずれも‘禅寺丸’(6.23 mg)より少なかったが、‘赤柿’(2.47 mg)より多かった。さらに、花粉発芽率は‘禅寺丸’が57.8%、また‘赤柿’が22.2%であったのに対し、‘2B62-2’では39.8%、‘2B105-1’では23.7%であった。一方、花粉管の長さや太さは‘禅寺丸’と比較して大きな違いはなかった(第5-1図)。「禅寺丸」の花粉は平均51.6 μm で、花粉の直径が主に40～60 μm に分布していたのに対し、‘2B62-2’の花粉は平均58.9 μm と1.14倍の大きさで、45～70 μm の範囲に広く分布していた(第5-2図)。

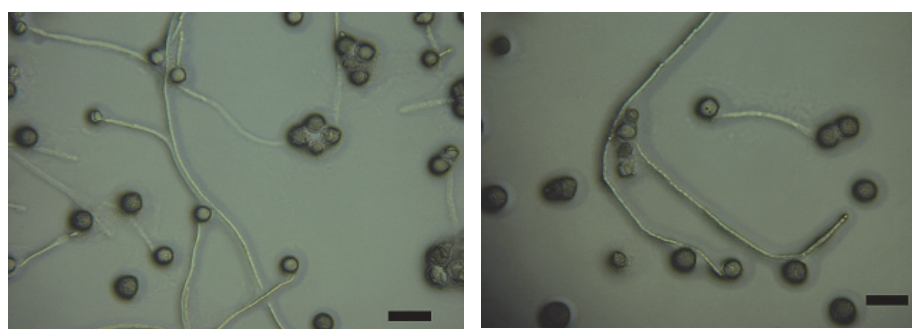
第5-1表 九倍体ならびに六倍体受粉樹の雄花着生数と花粉特性

品種・系統	倍数性	雄花着生数 ^z	1花当たり花粉量 (mg)±標準偏差	発芽率 ^y (%)
2B62-2	9x	14.7(42.9) ^x	4.24±0.66(68.0)	39.8(67.8)
2B105-1	9x	10.3(30.0)	3.70±0.83(59.4)	23.7(40.4)
赤柿	6x	—	2.47±0.76(39.6)	22.2(37.8)
禪寺丸	6x	34.3(100)	6.23±0.27(100)	58.7(100)

^z雄花着生数は、長さ20～30cmの結果母枝当たりに着生した花房数

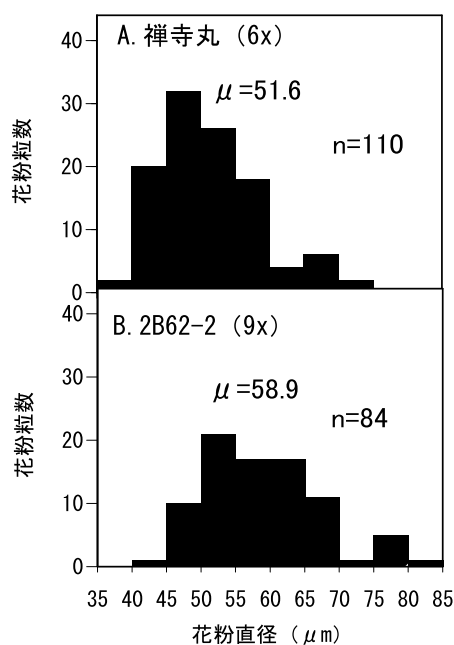
^y発芽率は、15%ショ糖を含む寒天培地上に置床し、25℃の温度条件で3時間後に測定

^x()は、‘禪寺丸’に対する比率を示す



第 5-1 図 倍数性の異なる品種・系統における花粉発芽の比較

左：‘禪寺丸’（6x），右：雄花着生九倍体系統‘2B62-2’（9x） スケールは 100 μ m



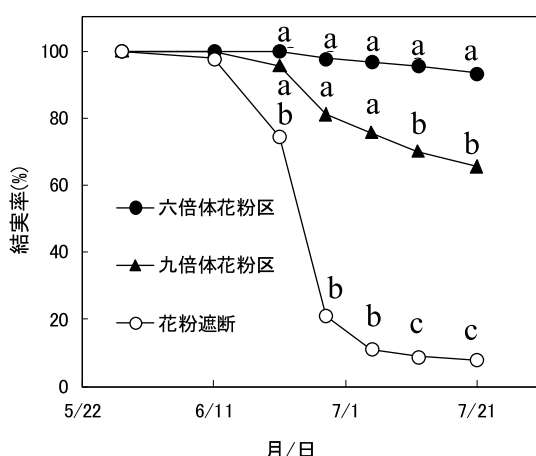
第 5-2 図 倍数性の異なる品種・系統における花粉直径の分布

()内は受粉樹の倍数性を示す， n は調査粒数， μ は平均値（ μ m）を示す

5.3.2 九倍体花粉の受粉が‘富有’の結実ならび種子の発育に及ぼす影響

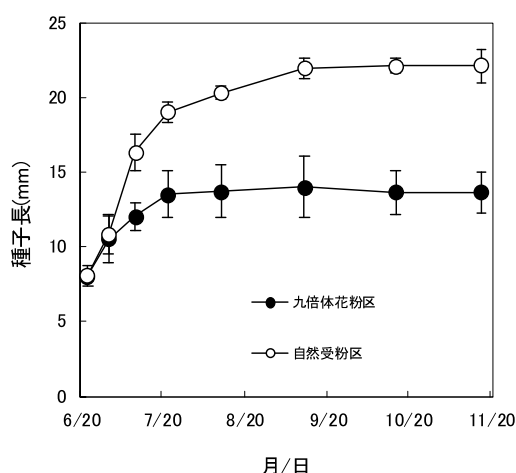
各試験区における結実率の推移を第 5-3 図に示した。六倍体花粉区では 6 月下旬から落果がわずかに見られ始めたが、7 月中旬には落果はほとんど見られなくなり、7 月 21 日における結実率は 93%であった。一方、花粉遮断区では 6 月下旬～7 月上旬にかけて急激に落果し、7 月 21 日における結実率は 7.8%となった。九倍体花粉区も 6 月下旬以降落果が始まったが、7 月 21 日における結実率は 66%と花粉遮断区よりも高かった。

六倍体花粉区ならびに九倍体花粉区における種子長の推移を第 5-4 図に示した。満開 44 日後に当たる 6 月 30 日までは、種子長に試験区間の差はなかった。しかし、それ以降には九倍体花粉区で種子の成長が劣り、満開 66 日後に当たる 7 月 22 日以降には種子長が 13 mm 程度で発育を停止した。九倍体花粉区における種子中には、7 月 10 日頃までは胚乳が見られたが、成熟期には胚乳や胚は肉眼ではほとんど認められなかった。



第 5-3 図 倍数性の異なる花粉の受粉が‘富有’の結実率に及ぼす影響

アルファベットは、異なる文字間で Tukey の多重検定により 5%水準で有意差があることを示す



第 5-4 図 倍数性の異なる花粉の受粉が‘富有’の種子長に及ぼす影響

垂線は標準偏差 (n=5~10) を示す

5.3.3 九倍体花粉の受粉が‘富有’の果実品質に及ぼす影響

各試験区における果実品質を第 5-2 表に示した。2009 年には花粉遮断区で、果重が小さく、糖度も低くなった。しかし、2010 年には果重や糖度に試験区間で違いは見られなかった。また、果皮色はいずれの年次にも試験区間で差はなかった。一方、果肉硬度はいずれの年次においても、九倍体花粉区ならびに花粉遮断区の方が六倍体花粉区より低かった。また、九倍体花粉区や花粉遮断区では果肉の褐斑が少なかった（第 5-5 図）。六倍体花粉区では、一果当たり 3.6～4.7 個の完全種子が形成されたのに対し、九倍体花粉区では一果当たり 1.0～2.0 個の不完全種子が形成された。また、花粉遮断区では種子は全く形成されなかった。各試験区における種子長の分布を第 5-6 図に、また種子の外観を第 5-7 図に示した。六倍体花粉区の種子長は平均 22.3 mm であった。一方、九倍体花粉区の種子長は平均 13.9 mm で、中には 20 mm 前後の大きなものもあったが、すべて重さ 0.7 g 未満の不完全種子であった。しかし、これらは‘平核無’の種子（平均 6.6 mm）よりも明らかに大きかった。なお、別の九倍体系統‘2B105-1’の花粉を受粉して得られた果実の種子も‘2B62-2’を受粉したものと同等の大きさであった。

第5-2表 受粉樹の倍数性の違いが‘富有’の果実品質に及ぼす影響

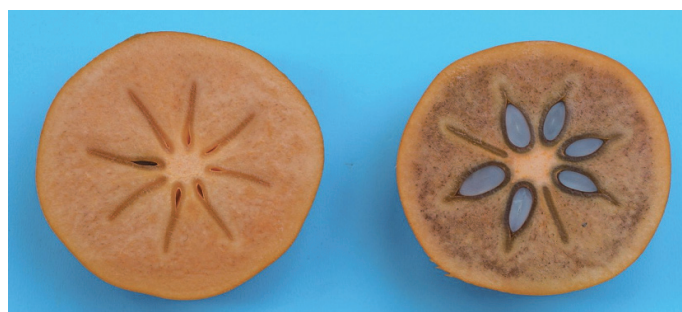
年次	試験区	果重 (g)	果皮色 ^z	硬度 ^y (kg)	種子数 (個/果)	糖度 (%)
2009	九倍体花粉区	305a ^w	6.3	1.5b	(1.0) ^x	16.6a
	花粉遮断区	260b	5.9	1.6b	0.0	15.8b
	六倍体花粉区	304a	6.0	1.8a	4.7	16.9a
2010	九倍体花粉区	255	5.0	1.8ab	(2.0)	15.6
	花粉遮断区	264	5.3	1.5b	0.0	15.8
	六倍体花粉区	260	5.0	2.1a	3.6	15.8

^z果皮色は赤道部をカキ用カラーチャートで測定

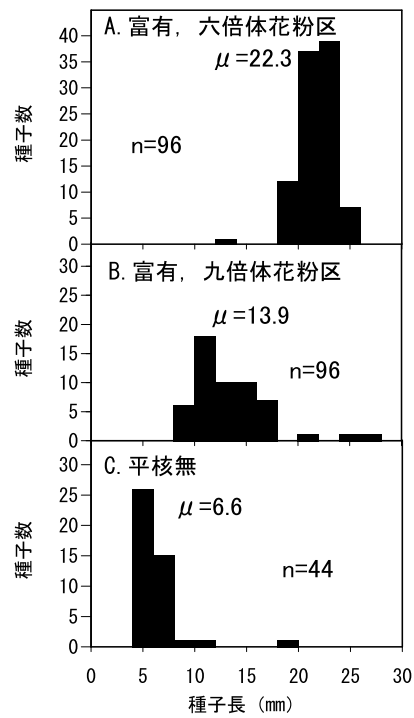
^y果肉硬度は円筒形プランジャーを装着したユニバーサル式硬度計で測定

^x()内は不完全種子数を示す

^wアルファベットは、異なる文字間でTukeyの多重検定により5%水準で有意差があることを示す



第 5-5 図 倍数性の異なる花粉を受粉したときの‘富有’の成熟果実断面の比較
左：九倍体花粉区，右：六倍体花粉区



第 5-6 図 倍数性の異なる花粉を受粉したときの種子長の分布
 収穫日は 2010 年 11 月 20 日, n は調査数, μ は平均値 (mm) を示す



第 5-7 図 倍数性の異なる花粉を受粉したときの種子の比較
 上段：平核無 中段：富, 九倍体花粉区 下段：富, 六倍体花粉区
 スケールは 10mm

5.4 考 察

一般に、三倍体植物は減数分裂異常により花粉の稔性が低いことが多く、ビワやスモモ、リンゴなどでも同様の報告がされている（茂木ら，2005；大沢ら，2009；佐藤・神戸，2007）．今回供試したカキの九倍体系統の花粉発芽率は‘禅寺丸’よりは低いものの，‘赤柿’と同等以上であることが確認された．また，発芽した花粉管の長さや太さも‘禅寺丸’と大きな違いはなく，さらに受精能力も認められており，他の三倍体植物の花粉とは挙動を異にしていた．この理由については今後詳細な検討を要する．

九倍体品種である‘平核無’の種子は開花 3～4 週間後頃より発育が鈍化し，その後ほとんどが発育を停止する（傍島ら，1975）．本試験の九倍体花粉区における‘富有’の種子は，満開 44 日後頃までは六倍体花粉区と同様な種子の発育を示し，満開 66 日後に発育を停止しており，‘平核無’の場合よりもやや遅くまで種子が発育を続けるものと考えられた．佐藤・神戸(2007)はリンゴの二倍体と三倍体の品種間で正逆交雑を行い，三倍体を花粉親に用いた方が種子の成長が優れ，その理由として三倍体を花粉親に用いた場合には，花粉発芽後胚嚢に到達するまでに競争受粉で厳しく選別され，異常の程度の比較的小さい，二倍体の花粉により近いものが受精するためとしている．今回の試験では，‘富有’に九倍体の花粉を受粉して形成された種子は，‘平核無’の種子よりも大きく，個体間差も大きかった．九倍体の花粉は，六倍体の花粉より直径の平均値が大きいだけでなく，個体間差が大きく，45 μm の六倍体の花粉に近いものから 70 μm の巨大花粉まで混在していた．このことから，花粉の倍数性異常の程度の違いが不完全種子の大きさに個体間差を生じさせた可能性が考えられるが，この点については更に検討を要する．

九倍体花粉区における結実率は，六倍体花粉区よりも低かったが，花粉遮断区よりも有意に高かった．梶浦（1943）はカキの単為結果力と種子形成力の品種間差異を調査し，‘富有’は種子形成力が強いが，単為結果力の弱い品種と位置づけている．一方，北島ら（1993）は，‘富有’の樹全体の花を花粉遮断することで無核化すると，結実率が高まることを報告している．本試験では，1 樹中に試験区を混在させており，果実間の養分競合が起きたため花粉遮断区の結実率が低下した可能性も否定できない．しかし，牛島ら（2012）は，福岡県において樹全体を花粉遮断した結果，90%近くの果実が落果し，この原因として，福岡県におけるカキの早期落果期に当たる 6 月上旬～7 月上旬まで 40 日間の日照時間が，他のカキ産地と比べて短いためとしている．また，山田ら（1987）も‘富有’を花粉遮断すると，結実性の年次変動が大きいことを示しており，完全無核果実の結実性には年次変動や地域における気象条件の影響が大きいものと思われる．今回の試験では，‘富有’にこれら九倍体系統の花粉を受粉することで，偽単為結果性を誘起し，このことで花粉遮断した果実よりも結実率が向上したものと考えられた．

果実品質には年次間差が見られ，2009 年の花粉遮断区において，果重ならびに果実糖度が低かったが，2010 年にはこれらには試験区間で違いは見られなかった．一方，いずれの年次においても九倍体花粉区と花粉遮断区で果肉硬度が低かった．果皮色や糖度から判断して，試験区間に果実の熟度に違いはなく，果肉硬度低下の原

因は、九倍体の花粉の受粉による種子の小粒化、あるいは花粉遮断により無核化となることで、果肉中の褐斑が少なくなったためと考えられた。

以上のように、カキの九倍体系統には花粉発芽能力を有するものがあり、これを‘富有’に受粉することで偽単為結果が誘起され、花粉遮断した場合よりも結実率が向上することが明らかとなった。成熟果実中には、‘平核無’の不完全種子よりも大きいものの、不完全種子のみが形成された。また、九倍体系統の花粉を受粉すると果肉硬度は低くなるが、果重や果実糖度、果皮色には違いはなかった。今回供試したような雄花を着生する九倍体系統のみを受粉樹として栽培園に栽植することで、‘富有’などの六倍体品種の種子を小粒化できる可能性が示唆された。今後は、他の栽培品種と九倍体系統の組み合わせによる交配親和性や結実率および果実品質等に及ぼす影響について確認する必要がある。

総合考察

カキ‘平核無’や‘刀根早生’は種子をほとんど形成しないが、その理由は長い間不明であったが、庄ら（1990）により、これらの品種は九倍体であることが明らかにされた。カキは基本的な倍数性が六倍体であり、九倍体は種内三倍体の特性を示す（Namikawa・Higashi, 1928；庄ら, 1990）。そのため、六倍体の花粉を受粉しても胚の成長が途中で停止し、無核となる。従って、カキの無核性果実を生産するためには、九倍体品種を育成することが実用的と考えられる。

一般に、三倍体の植物を作出するためには、四倍体と二倍体を交雑する方法が行われている。従って、カキにおいて九倍体を効率的に作出する場合には、十二倍体と六倍体を交雑することが有効と考えられるが、十二倍体は自然界には存在しないため、染色体倍加等の手法を使って、人為的に作出する必要がある。染色体倍加にはコルヒチンが使われることが多いが、カキにおける染色体倍加の事例としては、‘次郎’や‘駿河’のプロトプラストを材料に用いた報告がある程度である。しかし、この手法では再分化系が確立されている品種を材料として用いることが必要であり、適用できる品種が限定される（Tamura ら, 1995, 1996）。さらに、プロトプラストの取り扱いや細胞融合といった熟練を要する技術や特殊な装置を必要とする。そこで、利用する品種に制限がなく、かつ簡易な方法で染色体倍加するために、交雑実生の成長点に試験管内でコルヒチン処理する方法を検討した。その結果、試験管内で交雑実生の茎頂部に、コルヒチンを 0.03～0.05% の濃度で 12～24 時間処理することで、効率的に染色体倍加ができることが明らかとなった。作出した十二倍体は六倍体と比較して花蕾の着生率が低かったが、雌花と雄花を着生する個体を得られた。得られた十二倍体は完全甘ガキの果実を結実した。しかし、六倍体の花粉を人工受粉しても種子は得られなかった。一方、十二倍体の花粉は発芽能力を有することが確認され、さらにこれを六倍体品種に受粉した結果、不完全種子が形成されたことから（千々和ら, 2011）、九倍体完全甘ガキ育種のための花粉親として利用できる可能性が示唆された。

六倍体を種子親として利用する場合には、雌花を安定的に着生させる必要がある。果実品質が優れ、育種親としての利用価値が高い‘太秋’は雄花を着生する品種であり、雌花の着生が不安定となりやすい特性を持つ（千々和ら, 1997）。雄花の花芽分化時期は、雌花の花芽分化時期よりも早いと考えられている（Yonemori ら, 1993；林ら, 2001）。本研究では、徒長枝を切り返し、夏枝を伸長させることで花芽分化時期を遅らせ、雌花を安定的に着生させることができることを明らかにし、雄花着生品種を種子親として安定的に利用することを可能にした。しかし、カキは幼若性が強い樹種であり、播種から開花・結実までに長年月を要する。そのため、十二倍体の中間母本を作出し、それから九倍体品種を育成するには長大な年月が必要となる。

カンキツでは二倍体間交雑で生じた不完全種子から三倍体を得られることが知られている（Esen・Soost, 1971；Oiyama・Okudai, 1983）。カキにおいても、六倍体間交雑で不完全種子が生じることがあるが、本研究によりこれらの種子の一部から九倍体が作出できることが明らかとなった。本研究で得られた九倍体系統は、種子

親の‘富有’由来のアリルの一部を持っておらず、花粉親の‘太秋’のアリルをすべて持っていたことから、‘富有’の還元性雌性配偶子と‘太秋’の非還元性雄性配偶子との接合により生じたものと推測された。このように、本研究により、不完全種子を育種の材料として用いることで、十二倍体を中間母本に用いる必要がなくなり、育種年限を大幅に短縮できる可能性が示唆された。

カキの甘渋性は、完全甘ガキと非完全甘ガキに大きく分類される。甘渋性の遺伝に関して、完全甘ガキは非完全甘ガキに対して劣性であり、完全甘ガキに非完全甘ガキを交雑させた後、完全甘ガキを戻し交雑しても、完全甘ガキの出現頻度は15%程度しかない（池田ら，1985）。そのため、1回の交雑で完全甘ガキを育成するためには、完全甘ガキ間の交雑を行う必要がある。本研究においては、六倍体完全甘ガキ品種である‘富有’と‘太秋’の交雑から得られた九倍体系統から、果実品質の優れる無核性完全甘ガキ品種‘福岡 K1 号’（商標名：秋王）を育成した（千々和ら，2013）。‘福岡 K1 号’の成熟期は10月中旬～11月上旬であり、果重は350g、糖度（Brix）は19°、多汁で‘太秋’に似た食味を有していた。しかし、‘福岡 K1 号’は単為結果性、偽単為結果性とも強くなく、若樹齢樹では結実が不安定な欠点を有していた。

カキの落果防止には、植物ホルモンの一種であるジベレリンの散布が有効であり、‘富有’や‘伊豆’などの無受粉果実などでその効果が確認されている（林ら，1996；傍島ら，1969；Yamamura ら，1989）。また、カキにおいては摘蕾により結実率が向上することが知られている（文室，2003；堀江ら，1988）。‘福岡 K1 号’においても、ジベレリン散布や摘蕾により結実率が向上し、これらを組み合わせることで結果枝率を70%程度まで高めることができた。果実品質には処理による違いは見られず、これらは‘福岡 K1 号’の結実率向上に有効な方法と考えられた。

カキは、苗木の定植から成園化までも長い年月を要する。もし、既存の品種を簡易に無核化することができれば、品種更新によるカキ生産者の収益を落とさずに無核果実の生産が可能となる。

‘平核無’などの九倍体カキ品種は、六倍体受粉樹の花粉との受精後に胚の成長が途中で停止する偽単為結果性を示すことが知られている（傍島ら，1975）。本研究では、逆に六倍体品種に九倍体の花粉を受粉することで偽単為結果を誘起させ、‘富有’などの既存有核性品種の無核化の可能性を検討した。

一般に、三倍体の植物は減数分裂異常により花粉の稔性が低い（大林ら，2009；佐藤・神戸，2007；八幡ら，2005）。今回供試したカキの九倍体系統の花粉発芽率は‘禅寺丸’よりは低いものの、受粉樹として利用されている‘赤柿’と同等以上であることが確認された。

九倍体系統の花粉を人工受粉した‘富有’の種子は、発育初期には正常に発育したが、その後成長を停止し、成熟期には不完全種子となった。

九倍体花粉受粉区における結実率は、六倍体花粉受粉区よりも低かったが、花粉遮断区よりも有意に高いことから、九倍体系統の花粉を受粉することで、六倍体品種の偽単為結果性を誘起できることが確認できた。また、果重や糖度、果皮色などには受粉樹の倍数性による違いは見られず（千々和ら，2012）、既存有核性品種において無核果実を安定的に生産できる可能性が示唆された。

以上、本研究により、六倍体カキ品種間交雑から九倍体を作出する手法を開発し、果実品質の優れる無核性九倍体完全甘ガキ品種‘福岡 K1 号’を育成した。本品種は、世界初の完全甘ガキ品種であり、食べやすいだけでなく、大果で食味が優れるため需要拡大が期待できることから、本品種の普及拡大により、カキ産地の活性化が図られるものと考えられる。

また、本研究では九倍体作出のための中間母本となる十二倍体作出法を開発した。今後は、育成した十二倍体系統を中間母本とした効率的な九倍体の作出法を確立し、中生品種である‘福岡 K1 号’とは熟期の異なる品種を育成し、早生から晩生までの無核性品種を構築することも重要である。また、無核性品種の安定生産を図るため、本研究で開発した倍数性変異育種を発展させ、変異に富んだ後代を作出することで、単為結果力の高い品種の育成を行うことが重要と考えられる。さらに、本研究では既存品種の無核果実生産技術についても検討した。その結果、九倍体系統の花粉を受粉させることで、無核果実生産の可能性があることを明らかにした。今後は、実用化を視野に入れ、九倍体系統をほ場内に受粉樹として栽植した場合における結実性や果実品質等について検討を行う必要がある。

摘 要

カキ (*Diospyros kaki* Thunb.) は、日本における主要な果樹品目の一つである。カキ品種の多くは六倍体 ($2n=6x=90$) であり、主要品種である‘富有’は栽培が容易で収量性が高いが、単為結果力が弱いことため結実安定には種子を形成させる必要があることから食べにくく、現在の消費者の嗜好性に必ずしも適合していない。一方、平核無’や‘刀根早生’などは肉質が良好であり、かつ九倍体 ($2n=9x=135$) の無核性であり現在の消費者の嗜好性に適合している。しかしながら、これらの品種はいずれも渋ガキであるため脱渋が必要であり、脱渋後の日持ち性も低下する。したがって、無核性完全甘ガキ果実の生産が望まれている。九倍体を作出するためには、十二倍体を母本とし、これと六倍体を交雑することが効率的と考えられるが、十二倍体は自然界には存在しないため、人為的に作出する必要がある。また、カキは甘渋性により完全甘ガキ (PCNA) と非完全甘ガキ (non-PCNA) に大別され、完全甘ガキは、非完全甘ガキに対して遺伝的に劣性であるため、一回の交雑で完全甘ガキを育成するためには、完全甘ガキ同士の交雑を行う必要がある。そこで第 1 章では、カキの十二倍体完全甘ガキ中間母本を作出するため、六倍体完全甘ガキ間の交雑実生の染色体倍加を行った。試験管内で交雑実生の茎頂部に、コルヒチンを 0.03~0.05 % の濃度で 12~24 時間処理することで、効率的に染色体倍加ができた。十二倍体個体は六倍体個体と比較して花蕾の着生率が低かったが、雌花と雄花を着生する個体が得られた。これらは完全甘ガキ果実を着生し、花粉発芽能力が確認され、六倍体品種に受粉すると不完全種子が形成されることから、九倍体完全甘ガキ育種のための母本となる可能性が高いものと考えられた。

カキは雌雄異花であり、雄花を着生する品種は、樹齢の進行や樹勢の低下に伴い雌花の着生数が減少するため、雄花着生品種を交雑育種における種子親として利用する場合には、雌花を安定的に着生させることが育種の効率化につながる。第 2 章では、種子親となる六倍体品種に雌花を安定的に着生させるための、結果母枝育成法について検討した。その結果、これまで樹形を乱すために剪除していた徒長枝を 5~6 月に 15cm 程度の長さに切り返し、そこから夏枝を発生させることで、翌年の雌花が多く着生し、種子を多く獲得出来ることを明らかにした。

カキは幼若性が強い樹種であり、播種から開花・結実までに長年月を要す。そのため、十二倍体の中間母本を作出し、それから九倍体品種を育成する方法では新品種の育成までにさらに長い年月を必要とする。そこで、第 3 章では育種年限を短縮することを目的に、六倍体完全甘ガキである‘富有’に‘太秋’を交配して得られた不完全種子を胚培養して、その倍数性を明らかにするとともに、その由来を検討した。得られた種子は 1078 個で、うち不完全種子数は総数の 6.3% にあたる 68 個であった。不完全種子を胚培養した結果、発芽したものは 10 個体で、うち 2 個体は成長点がない異常胚で、いずれも九倍体であった。一方、正常胚の 8 個体はすべて六倍体であった。2 個体の九倍体実生には、いずれも‘太秋’に特有なアリルが検出されが、‘富有’に特有なアリルの一部が検出されなかった。これらのことから、得られた九倍体実生は‘富有’の還元配偶子と‘太秋’の非還元配偶子の接合によって生じた可能性が示唆された。

第4章では、六倍体完全甘ガキ品種の‘富有’と‘太秋’との交雑で生じた不完全種子の胚培養で得られた九倍体系統から、果実品質の優れる完全甘ガキ品種‘福岡 K1 号’（商標名：秋王）を育成し、その特性を明らかにするとともに、早期落果防止法について検討した。‘福岡 K1 号’の成熟期は‘太秋’とほぼ同時期で、10月中旬～11月上旬であった。果重は平均 365 g で‘富有’より大きく、‘太秋’と同程度であった。果実糖度（Brix）は平均 19.6° で果肉硬度は柔らかく、肉質は粗で食味は良好であった。しかし、単為結果性および偽単為結果性ともに強くなく、若樹齢樹では結実がやや不安定であったが、200 ppm のジベレリンを満開 10 日後に散布すること、あるいは摘蕾することにより結実性が高まり、これらを組み合わせることで結実率がさらに高まることを明らかにした。

九倍体品種である‘平核無’は、単為結果性を持つとともに、六倍体受粉樹の花粉の受精後に胚の成長が途中で停止する偽単為結果性を示す。逆に、六倍体品種に九倍体の花粉を受粉することで偽単為結果を誘起することができれば、‘富有’などの既存品種の無核果実を安定的に生産できる可能性がある。そこで、第5章では、九倍体系統の花粉を用いた受粉が、‘富有’の結実と果実品質へ及ぼす影響を調査した。九倍体系統の花粉には発芽能力が認められた。九倍体系統の花粉を受粉した果実の結実率は、六倍体品種‘禅寺丸’の花粉を受粉した場合に比べて低かったが、花粉遮断したものより明らかに高く、偽単為結果が誘起されたことが確認された。九倍体系統の花粉を受粉した果実の重さや糖度、果皮色は六倍体花粉区と差はなかったが、果肉中の褐斑が少なく、果肉硬度が低かった。九倍体系統の花粉を受粉した果実中の種子は、すべて不完全種子であったが、九倍体品種である‘平核無’のものよりも大きかった。

謝 辞

本研究の遂行ならびに本論文の作成にあたり、懇切なる御指導と御校閲を賜った鹿児島大学農学部准教授 山本雅史博士に心から感謝の意を表する。また、本論文の作成にあたり御校閲と貴重な御示唆を賜った鹿児島大学農学部教授 富永茂人博士，鹿児島大学農学部教授 橋本文雄博士，鹿児島大学農学部准教授 久保達也博士，佐賀大学農学部教授 穴井豊昭博士に厚く御礼申し上げる。さらに、本研究の遂行に当たり技術的なご支援をいただいた宮崎大学農学部教授 鉄村琢哉博士，近畿大学農学部講師 神崎真哉博士，京都大学農学研究科准教授 田尾龍太郎博士に心より感謝の意を表する。

本研究に取り組む機会を与えて頂き、有益な助言と激励を賜った元佐賀大学農学部教授 松本亮司博士，福岡県農林業総合試験場副場長 矢羽田第二郎博士，元福岡県農業総合試験場豊前分場長 大庭義材氏，元福岡県農業総合試験場果樹苗木分場長 堀江裕一郎氏，果樹部長 栗村光男博士，福岡県朝倉普及指導センター所長 林 公彦氏，福岡県久留米普及指導センター課長 平川信之氏および能塚一徳氏に心から感謝申し上げます。また，本研究の遂行に際し御支援頂いた福岡県経営技術支援課の牛島孝策氏，福岡県農林業総合試験場の栞原 実氏，岩隈正彦氏，石井 豊氏，朝隈英昭氏，石坂 晃氏，白石美樹夫博士，村本晃司氏他果樹部の皆様並びに福岡県南筑後普及指導センターの藤島宏之氏に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- Bretagnolle, F. and J. D. Thompson. 1995. Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. *New Phytol* 129: 1-22.
- 千々和浩幸・朝隈英昭・石坂 晃. 2013. 無核性完全甘ガキ品種‘福岡 K1 号’の育成ならびにジベレリン散布と摘蕾による結実安定効果. *園学研*. 12: 263-267.
- 千々和浩幸・林 公彦. 2007. カキ‘西村早生’の徒長枝摘心による結果母枝育成. *園学研*. 6: 265-270.
- 千々和浩幸・栞原 実・平川信之・白石美樹夫・藤島宏之. 2011. 験管内コルヒチン処理による力キの十二倍体作出とその生育特性. *園学研*. 10: 309-314.
- Chijiwa, H., M. Kuwahara, N. Hirakawa and T. Tetsumura. 2008. Generation of nonaploid persimmons (*Diospyros kaki* Thunb.) by embryo culture of imperfect seeds derived from a cross between 'Fuyu' and 'Taishuu'. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 77: 358-363.
- 千々和浩幸・谷川宏行・朝隈英昭・石坂 晃・田尾龍太郎. 2012. 九倍体系統の花粉を用いた受粉がカキ‘富有’の結実ならびに果実品質に及ぼす影響. *園学研*. 11: 485-489.
- 千々和浩幸・牛島孝策・林 公彦. 1997. 福岡県におけるカキ‘太秋’の生育, 果実品質着花及び花粉に関する特性. *福岡農総試研報*. 16:82-86.
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
- Esen, A. and R. K. Soost. 1971. Unexpected triploids in *Citrus*. Their origin, identification, and possible use. *J. Hered.* 62: 329-333.
- 福井博一・西元和男・中村三夫. 1990. カキの茎頂培養における品種間差異. *園学雑*. 59: 51-57.
- 文室政彦. 2003. 被覆条件下のベッド栽培におけるカキ‘刀根早生’と‘新秋’の結実に及ぼす摘蕾および人工受粉の影響. *園学研*. 2: 179-182.
- 蜂巢統三. 1930. 柿の花芽分化に就いて. (第1報) 雌花. *園芸之研究*. 25:91-103.
- 長谷川耕二郎・今藤一馬・中島芳和. 1991. カキの花芽形成ならびに果実発育に及ぼす繰り返しせん定の影響. *園学雑*. 60:9-18.
- 林 公彦・千々和浩幸・牛島孝策. 1998. 開花期の降雹がカキの結実, 果実品質及び花芽着生に及ぼす影響. *福岡農総試研報*. 17:119-123.
- 林 公彦・千々和浩幸・牛島孝策. 2001. カキ‘太秋’の着花特性. *福岡農総試研報*. 20:58-62.
- 林 公彦・牛島孝策・千々和浩幸. 2000. カキ‘西村早生’の着花特性と花芽の分化および発育. *九農研*. 62:247.
- 林 公彦・牛島孝策・千々和浩幸・姫野周二. 1996. カキ‘伊豆’の生理落果防止に対する植物生長調節物質の効果. *福岡農総試研報*. 15: 82-86.
- 広瀬和栄・山本正幸・佐藤敬雄・大畑徳輔・西田光夫・池田 勇・志村 勲・柴 茂・八木正房・富永信行. 1971. カキ新品種‘伊豆’について. *園試報*. B11: 1-17.

- 堀江裕一郎・平島敬太・鶴 丈和. 1988. カキ ‘伊豆’ の生理落果に及ぼす着果制限と人工受粉の影響. 福岡農総試研報 B (園芸). 8: 15-18.
- 池田 勇・山田昌彦・栗原昭夫・西田光夫. 1985. カキの甘渋の遺伝. 園学雑. 54: 39-45.
- 石丸 恵・茶珍和雄・和田安規・上田悦範. 2001. 脱渋方法の異なるカキ'平核無'果実のペクチン質およびヘミセルロースの変化と軟化との関係. 日食保誌. 27: 197-204.
- Itamura, H., Q. Zheng and K. Akaura. 2005. Industry and research on persimmon in Japan. Acta Hort. 685:37-43.
- 梶浦 実. 1943. 柿の生理的落果に関する研究 II 授粉及単為結実と落果との関係. 園学雑. 12: 247-283.
- 金好純子・古田貴音・蔵尾公紀・山口 聡. 2008. 単胚性カンキツにおけるコルヒチン処理による四倍体の作出とその種子親としての利用による三倍体の獲得. 園学研. 7: 5-10.
- Kitajima, A., H. Akuta, T. Yoshioka, T. Entani, M. Nakano and M. Ishida. 1992. Influence of seeded fruit on seedless fruit set in Japanese persimmon cv. Fuyu (*Diospyros kaki* L. f.). J. Japan. Soc. Hort. Sci. 61: 499-506.
- 北島 宣・松本辰也・石田雅士・傍島善次. 1990. 遮光及び無遮光下におけるカキ樹の結果枝乾物蓄積量と生理落果との関係. 園学雑. 59: 75- 81.
- 北島 宣・大下義武・中野幹夫・石田雅士. 1993. カキ ‘富有’ の結果母枝, 主枝および樹体における単為結果性と果実品質. 園学雑. 62: 505-512.
- 松原茂樹・川人茂樹. 1938. 柿の花芽分化期に就いて. 園芸之研究. 34:72-81.
- 松村博行. 1997. 芽かきと捻枝. p. 11-14. 農業技術大系果樹編 第4巻. 農文協. 東京.
- 森口一志・松下丈権・松本秀幸・大政義久・崎本孝江. 2006. カキ ‘太秋’ ‘新秋’ の施設栽培について. 愛媛果試報. 20:7-17.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- 永沢勝雄・高橋英吉・野崎 勝. 1968. カキの落果に関する生理学的研究. 千葉大園学報. 16: 9-16.
- Namikawa, I. and M. Higashi. 1928. On the chromosomes in *Diospyros kaki* L. and *Diospyros lotus* L. Bot. Magaz. 42: 436-438.
- 西田光夫・池田 勇. 1961. カキの花芽分化に関する研究. 東海近畿農試研報. 園芸 6:15-32.
- 農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所. 2007. 育成系統適応性検定試験・特性検定試験調査方法. p.172-178.
- Notsuka, K., T. Tsuru and M. Shiraishi. 2000. Induced polyploid grapes via *in vitro* chromosome doubling. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 69: 543-551.
- Oiyama, I. and N. Okudai. 1983. Studies on the polyploidy breeding in citrus. 3 Occurrence of triploids in the progenies of diploid sweet oranges crossed with diploids. Bull. Fruit Tree Res. Stn. D5: 1-7.
- Ollitrault-Sammarcelli, F. Legave, J.M., Michaux-Ferriere, N. and A.M. Hirsch. 1994. Use of flow cytometry for rapid determination of ploidy level in the genus *Actinidia*.

- Sci. Hortic. 57: 303-313.
- 大林沙泳子・八幡昌紀・仲條誉志幸・藤井明子・向井啓雄・原田 久・高木敏彦. 2009. ニホンスモモ‘貴陽’における生殖器官の特徴と倍数性. 園学研. 8: 407-412.
- Ramanna, M. S. and E. Jacobsen. 2003. Relevance of sexual polyploidization for crop improvement. Euphytica 133: 3-18.
- Sanford, J. C. 1983. Ploidy manipulations. p.100-123. In: J. N. Moore and J. Janick (eds.). Methods in fruit breeding. Purdue Univ. Press, West Lafayette.
- 佐藤正志・神戸和猛登. 2007. リンゴ二倍性品種と三倍性品種の正逆交雑における初期生育の良好な実生の獲得効率の比較と育種の可能性. 園学研. 6: 347-354.
- Sugiura, A., T. Ohkuma, Y. A. Choi, R. Tao and M. Tamura. 2000. Production of nonaploid ($2n = 9x$) Japanese persimmons (*Diospyros kaki*) by pollination with unreduced ($2n = 6x$) pollen and embryo rescue culture. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 125: 609-614.
- Sugiura, A. and T. Tomana. 1983. Relationship ethanol production by seeds of different types of Japanese persimmon and their tannin content. HortScience 18:319-321.
- 傍島善次・石田雅士・稲葉昭次. 1975. カキ果実の発育に関する研究. 第 2 報 平核無の種子の発育不全について. 園学雑. 44:1-6.
- 傍島善次・石田雅士・瀬川薫雄・崎山 睦. 1969. カキの生理的落果防止に関する研究. II 受粉および GA 処理が生理的落果に及ぼす影響ならびに果実内オーキシンの消長について. 京都府大農学報. 21: 12 - 23.
- 高馬 進. 1942. 富有柿増産と所謂徒長枝の結果枝化. 農及園. 16:1237-1240.
- Tamura, M., R. Tao and A. Sugiura. 1995. Regeneration of somatic hybrids from electrofused protoplasts of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* L.). Plant Sci. 108: 101-107.
- Tamura, M., R. Tao and A. Sugiura. 1996. Production of dodecaploid plants of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* L.) by colchicine treatment of protoplasts. Plant Cell Rep. 15: 470-473.
- Tao, R., H. Murayama, K. Moriguchi and A. Sugiura. 1988. Plant regeneration from callus cultures derived from primordial leaves of adult Japanese persimmon. HortScience 23: 1055-1056.
- 田尾龍太郎・山田あゆみ・江角智也・本杉日野・杉浦 明. 2003. 六倍体カキ'藤原御所'の実生における倍数性変異. 園学研. 2: 157-160.
- 牛島孝策・藤島宏之・松田和也. 2012. 福岡県におけるカキ‘富有’の花粉遮断による無核化が早期落果および果実品質に及ぼす影響. 福岡農総試研報. 31: 54-56.
- 脇坂 聡・神崎真哉・高松善博・宇都宮直樹. 2003. SSR マーカーを用いたカキの品種識別. 園学雑. 72 別 1: 144.
- 八幡茂木・佐藤三郎・小原 均・松井弘之. 2005. ビワの倍数性による形態および結実特性の差異と二倍体と四倍体の交雑による三倍体の獲得. 園学研. 4: 379-384.
- 米森敬三・亀田克巳・杉浦 明. 1992. カキの雌花, 雄花の着花特性について. 園学雑. 61:303-310.

- Yonemori, K., A. Sugiura, K. Tanaka and K. Kameda. 1993. Floral ontogeny and sex determination in monoecious-type persimmons. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 118:293-297.
- 米山寛一・脇坂津雄. 1957. 柿樹の貯蔵養分と花芽の発育. *農及園*. 32:59-60.
- 八幡茂木・佐藤三郎・小原 均・松井弘之. 2004. アミプロフオスメチルおよびコルヒチンによるビワ四倍体の作出. *園学研*. 3: 339-344.
- 山田あゆみ. 2007. 非還元配偶子を利用した交雑によるカキ (*Diospyros kaki* Thunb.) の倍数性育種に関する研究. 京都大学大学院博士論文.
- 山田あゆみ・江角智也・田尾龍太郎・杉浦 明. 2003. 開花前の低温がカキの非還元花粉の発生に及ぼす影響. *園学雑*. 72 別 1: 208.
- Yamada, A. and R. Tao. 2006. High frequency polyploidisation observed in hexaploid Japanese persimmon (*Diospyros kaki*) 'Fujiwaragoshō'. *J. Hortic. Sci. & Biotech.* 81: 402-408.
- Yamada, A. and R. Tao. 2007. Controlled pollination with sorted reduced and unreduced pollen grains reveals unreduced embryo sac formation in *Diospyros kaki* Thunb. 'Fujiwaragoshō'. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 76: 133-138.
- Yamada, M. 1994. Persimmon. p.47-52. In: Organizing Committee XXIVth International Horticultural Congress Publication Committee (eds.). *Horticulture in Japan*. Asakurashoten, Tokyo.
- Yamada, M. 2006. Persimmon. p.72-81. In: The Japanese Society for Horticultural Science (eds.). *Horticulture in Japan*. Asakurashoten, Tokyo.
- 山田昌彦・栗原昭夫・角 利昭. 1987. カキの結実性の品種間差異とその年次変動. *園学雑*. 56:293-299.
- Yamamura, H., K. Matsui and T. Matsumoto. 1989. Effects of gibberellins on fruit set and flower bud formation in unpollinated persimmons (*Diospyros kaki*). *Sci. Hortic.* 38: 77-86.
- 山根弘康・栗原昭夫. 1980. ブドウの倍数性育種に関する研究 II コルヒチン処理による四倍体の育成. *果樹試報*. E3: 1-13.
- 山根弘康・山田昌彦・栗原昭夫・吉永勝一・平川信之・佐藤明彦・松本亮司・岩波宏. 1995. カキ新品種 '太秋'. *園学雑*. 64 別 2: 184-185.
- 矢野 隆・新開志帆・森口一志. 1999. カキ '刀根早生' の生理落果抑制法に関する研究. 第 2 報 環状はく皮方法の違いが生理落果抑制, 果実形質に及ぼす影響. *愛媛果試報*. 13:19-26.
- 庄 東紅. 1990. カキ (*Diospyros kaki* Linn.f.) 品種の細胞遺伝学的研究. 京都府立大学大学院農学研究科博士論文.
- 庄 東紅・北島 宣・石田雅士. 1992. カキ無核品種の種子形成および染色体数. *園学雑*. 60: 747-754.
- 庄 東紅・北島 宣・石田雅士・傍島善次. 1990. 栽培カキの染色体数について. *園学雑*. 59: 289-297.

Developmental Studies of Production Methods for Seedless Pollination-Constant Non-Astringent (PCNA)-Type Fruits in Japanese Persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.)

Summary

Japanese persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) is an important fruit tree in Japan with numerous cultivars, many of which are hexaploid ($2n = 6x = 90$). One of the major cultivars is 'Fuyu', a pollination-constant non-astringent (PCNA)-type persimmon in Japan. 'Fuyu' does not have parthenocarpic ability; as a consequence, pollination is necessary to prevent June drop, and only seeded fruits are produced. In contrast, several nonaploid cultivars ($2n = 9x = 135$), such as 'Hiratanenashi' and its bud sports, are increasingly grown in commercial culture for their seedless fruits of good eating quality. Because these nonaploid cultivars are astringent types, astringency must be removed before shipment, which shortens shelf life. The production of non-astringent seedless persimmon fruits is thus of great interest.

The purpose of this study is to produce non-astringent-type seedless persimmon fruits both through breeding and cultivation.

Chapter 1. Dodecaploid Persimmons Induced by *In Vitro* Colchicine Treatment and Their Growth Characteristics.

Analogous to the production of triploids *via* pollination of diploids with tetraploids, it should be possible to generate nonaploid persimmons by pollinating hexaploid cultivars with dodecaploids ($2n = 12x = 180$). Because no naturally occurring dodecaploids exist, however, artificial chromosome doubling must be used. In addition, inter-crossing between PCNA genotypes is necessary for breeding PCNA-type Japanese persimmons, because the PCNA phenotype is recessive to non-PCNA phenotypes.

Chromosome doubling induced by colchicine treatment of seedlings derived from a cross between PCNA hexaploid persimmons was carried out to generate dodecaploid persimmons. *In vitro* colchicine treatment of seedling meristem for 12–24 hours was effective at a concentration of 0.03–0.05%. Induced dodecaploid seedlings generally exhibited weak vigor, but some vigorous seedlings were obtained. Compared with the hexaploid parental cultivars, these dodecaploid seedlings had longer stomatal guard cells and lower stomatal

densities. Although the rate of flower bud formation on dodecaploid seedlings was lower than that of the hexaploid seedlings, some of the seedlings bore both pistillate and staminate flowers the pollen germination ability. Dodecaploid seedlings bore PCNA-type fruits; however, they did not form seeds when pollinated with hexaploid pollen. On the other hand, imperfect seeds were formed when pollinated to hexaploid persimmons with dodecaploid pollen. These findings suggest dodecaploid persimmons could be used as a pollen parent for the breeding of nonaploid PCNA persimmons.

Chapter 2. Generation of Fruiting Mother Shoots from Water Sprout by Pinching in Japanese Persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.).

Two important parental cultivars for persimmon breeding are ‘Nishimura-Wase’, which is early maturing, and ‘Taishuu’, which produces large, good-tasting fruits. Persimmon has diclinous flower bud differentiation, ‘Taishuu’ and ‘Nishimura-Wase’ produce many more staminate flowers than pistillate flowers with age or weakening tree vigor. Thus, it is very important to have well-nourished shoots bearing numerous pistillate flowers to use these cultivars as seed parents.

Because they distort tree shape and block sunlight exposure, water sprouts are usually pruned out during the growing season. As described in this chapter, I tried to form fruiting mother shoots from water shoots by pinching the latter in spring. Summer shoots growing from water shoots pinched from May to June bore more pistillate flowers and fewer staminate flowers than did normal shoots. Pinched water shoots that did not sprout summer shoots produced pistillate and staminate flowers in ratios similar to non-pinched plants. Although no difference was observed in numbers of flowers among pinching dates, pinching in early May is preferable, as it leads to a higher percentage of summer shoots sprouting from water shoots than does pinching after late May. There was no difference in seed numbers per fruit between experimental plots, but total seed numbers from summer shoots produced by water shoot pinching were much higher than those from normal shoots. Based on these findings, pinching water sprouts from May to June is an effective method for generating fruiting mother shoots for the following year.

Chapter 3. Generation of Nonaploid Persimmons by Embryo Culture of Imperfect Seeds Derived From a Cross between ‘Fuyu’ and ‘Taishuu’.

Because persimmon has the property of long juvenility, fruit production will be extremely delayed when nonaploid seedlings are generated *via* dodecaploid parents. If nonaploid seedlings are generated directly from inter-crossing between hexaploids, breeding periods can be drastically shortened. In some citrus species, triploid offspring have been derived from imperfect seeds produced by inter-crossing diploids. As detailed in this chapter, I similarly

aimed to obtain nonaploid seedlings from imperfect seeds by embryo culture using a cross between the hexaploid PCNA cultivars ‘Fuyu’ and ‘Taishuu’. An additional goal was to clarify the origin of nonaploid embryos from imperfect seeds.

Seeds were collected from 300 fruits. Of 1,078 seeds, 68 (6.3%) were imperfect, 10 of which germinated into seedlings. Eight of these seedlings developed into normal-appearing plantlets with normal growth, while the remaining two produced abnormal plantlets without meristems at either shoot apex or root tip. Two seedlings were recovered from the abnormal plantlets *via* callus, and grew vigorously in the greenhouse. Cytogenetic analysis confirmed that these two seedlings were nonaploids. Parental analysis using four simple sequence repeat (SSR) markers, D.CT-13, 24, 61, and 179, revealed that each nonaploid seedling had alleles originating from the parents, indicating that they were generated by syngamy. The two nonaploid seedlings had 222-bp alleles at D.CT-61, specific to ‘Taishuu’, the pollen parent, but did not have the 136- or 140-bp alleles at D.CT-179, characteristic of ‘Fuyu’, the seed parent. These results suggest that the seedlings may have been derived from fertilization of a reduced female gamete with an unreduced male gamete.

Chapter 4. Development of Seedless PCNA Persimmon Cultivar ‘Fukuoka K1 Gou’ and the Effect of Gibberellin Spray and/or Disbudding on Fruit Set.

I developed the nonaploid PCNA persimmon cultivar ‘Fukuoka K1 Gou’ (TM; Akiou) by embryo culture of imperfect seeds derived from a cross between the hexaploid PCNA cultivars ‘Fuyu’ and ‘Taishuu’. ‘Fukuoka K1 Gou’ was confirmed to bear seedless PCNA-type fruits. ‘Fukuoka K1 Gou’ fruit ripens from mid-October to early November, nearly the same time period as ‘Taishuu’. Fruit-soluble solids content was 19.6 °Brix, which was higher than that of ‘Fuyu’ and ‘Taishuu’. Fruit weight, 365 g, was greater than that of ‘Fuyu’ and almost identical to that of ‘Taishuu’. Fruit skin of ‘Fukuoka K1 Gou’ at harvest time was less reddish than that of ‘Fuyu’. Parthenocarpic and stenospermocarpic abilities of ‘Fukuoka K1 Gou’ were low, causing unstable fruit set, especially in young trees. Spraying fruit with 200 ppm gibberellin 10 days after full bloom and disbudding both improved fruit set. In addition, a combination of the two treatments was significantly more effective than either treatment alone.

Chapter 5. Effect of Pollination with Nonaploid Persimmon Pollen on Fruit Set and Fruit Quality in ‘Fuyu’, a Hexaploid Persimmon.

The nonaploid astringent cultivar ‘Hiratanenashi’ has both parthenocarpic and stenospermocarpic ability. As a consequence, seeds of ‘Hiratanenashi’ abort when pollinated with pollen from hexaploid persimmons, preventing June drop. If a hexaploid cultivar was pollinated with pollen from a nonaploid persimmon,

stenospermocarpy might be induced.

In the experiments described in this chapter, I investigated fruit set and fruit quality of hexaploid 'Fuyu' pollinated with nonaploid persimmon pollen. The goal of this research was to explore the possibility of a novel cultural practice for seedless 'Fuyu' fruit production. Pollen from nonaploids germinated normally; pollen germination rates were lower than in the hexaploid 'Zenjimaruru' but similar to those in 'Akagaki'. Although a much higher rate of fruit set was observed in pollinated than in non-pollinated 'Fuyu', the rate was lower after pollination with pollen from nonaploid plants (nonaploid pollination) than from hexaploid plants (hexaploid pollination). Seeds from nonaploid pollination grew as well as those from hexaploid pollination until 44 days after full bloom. At that point, however, growth of seeds from nonaploid pollination slowed and finally stopped, resulting in a final seed size approximately two-thirds the size of seeds obtained with hexaploid pollination. Fruit weight, total soluble solid content, and skin color of fruit from nonaploid pollination was almost indistinguishable from that of fruits from hexaploid pollination, whereas flesh firmness was lower with nonaploid than hexaploid pollination.