

## ビワとバラ科ナシ亜科植物の属間雑種作出の試み

福田伸二・山本俊哉<sup>a</sup>・富永由紀子<sup>1</sup>・根角博久<sup>2</sup>

Possibility of Intergeneric Hybrids between Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) and Other *Rosaceae* Plants

Shinji FUKUDA, Toshiya YAMAMOTO, Yukiko TOMINAGA and Hirohisa NESUMI

### 緒 言

ビワ (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.) の品種改良において、果実の超大果性、日持ち性およびおいし性形質などの新形質を付与することは、重要な育種目標である。しかし、既存のビワ品種の中にはそのような遺伝資源は見当たらない。そこで、ビワとの属間雑種を育成し、目標形質を導入することも検討しなければならない。

リンゴ (*Malus x domestica* Borkh.) , ニホンナシ (*Pyrus pyrifolia* (Burm. f.) Nakai) , シャリンバイ (*Rhaphiolepis indica* (L.) Lindl. ex Ker var. *umbellata* (Thunb.) H. Ohashi) およびボケ (*Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai) は、ビ

本研究は農林水産省指定試験事業により得られた成果である。

<sup>a</sup> 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所

<sup>1</sup> 現在：長崎県科学技術振興局

<sup>2</sup> 現在：独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所カンキツ研究興津拠点

ワと同じバラ科ナシ亜科に属し、染色体の基本数が17本と同じであることから、属間雑種作出の可能性を有する。ナシ亜科植物を用いた属間雑種の育成については、リンゴ属 (*Malus* Mill.) とナシ属 (*Pyrus* Linn.) において、耐寒性や耐病性などの新形質導入の目的で試みられている (Crane・Markes, 1952 ; 志村ら, 1980) 。特にニホンナシとマルメロ (*Cydonia oblonga* Mill.) (志村ら, 1983) を用いた組合せでは、雑種育成個体が開花まで至っている。しかし、Weber (1964) のバラ科植物の属間雑種育成例の報告においては、ビワ属を用いた属間雑種作出の報告はない。それ以後、マルメロ、ヤマナシおよびシャリンバイを台木として供試し、おいし性台木の検討を試みた事例 (中尾ら, 1992) はあるが、属間雑種育成の報告は見当たらない。そこで、リンゴの日持ち性、ナシの超大果性、シャリンバイやボケの低木性などの優れた形質をビワ属へ導入する目的で数種類のバラ科ナシ亜科植物とビワ属との雑種の作出を試みたので報告する。

## 材料および方法

### 1. 属間雑種の作出

ビワ属とその近縁属の属間雑種の作出を目的として2001年および2002年に交雑試験を行った。植物は、ビワ (*Eriobotrya japonica*) 品種‘茂木’，‘長崎13号’〔長崎早生×137-1 (シャンパンセルフ)〕，タイワンビワ (*Eriobotrya deflexa* (Hemsl.) Nakai) ‘De-1’，ニホンナシ (*Pyrus pyrifolia*) 品種‘幸水’，‘豊水’，‘新水’，シャリンバイ (*Rhaphiolepis indica*) ‘Rha-1’ およびボケ (*Chaenomeles speciosa*) ‘Cha-1’ を供試した。

ビワの母樹は、寒害による被害を避けるためにハウス内で12月中旬から4月までの間、最低温度10℃以上で管理した。受粉に用いた花粉は、開花直前の花らいを採取し、花卉除去後に開やくし、シリカゲルと共にポリエチレン袋に密封し、-20℃で保存したもので、保存期間が1年未満のものを使用した。交雑は開花3~5日前の花らいを選んで除雄した後、その柱頭上にそれぞれの花粉が十分付着するよう面相筆で受粉させた。受粉後は直ちにクラフト紙製の袋を被せ、他品種との交雑を防止した。その後、成熟期に結果率を調査すると共に種子が確認できたものについては、播種し実生の育成を行い、葉の形質および生育について観察した。

### 2. 属間雑種の確認

獲得した個体については、SSR マーカーにより属間雑種の確認を行った。

Total DNA は幼葉から CTAB 法 (Doyle・Doyle, 1987) により抽出し、ミニフルオロメーター (Hofer Scientific 社製) を用いて各個体の Total DNA を10 mg・L<sup>-1</sup> に調整した。

SSR マーカーのプライマーとして、リンゴ由来の8種類 CH02b10, 02b1, CH01h01, CH02b03b, CH02f06, 28f4, CH01h10, CH01g12 (Guilford ら1997: Gianfranceschi ら, 1998) を用いた。PCR は20 μL 反応液で行い、

10 ng 鋳型 DNA, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 unit Taq polymerase (Invitrogen 社製), 200 μM dNTPs, 蛍光色素 (FAM, TET および HEX) でラベルした10 pmol の forward プライマーおよび蛍光色素でラベルしてない reverse プライマーを添加した。PCR の反応条件は、①94℃で1分間の熱変性、②94℃で1分の熱変性、③55℃で1分のアニーリング、④72℃で2分間の伸長反応とし、②~④の過程を35サイクル行い、最後に72℃で10分間の再伸長反応を行った。PCR 反応での増幅産物は、PRISM377 DNA sequencer (PE Applied Biosystems 社製) を用いて、分離、検出した。増幅産物に内部標準 DNA を混合し、GeneScan software (PE Applied Biosystems 社製) を用いて増幅産物の大きさを推定した。

親子関係は両親からその子供へ、各 SSR 座における1つの対立遺伝子が伝達されるかどうかに基づいて確認した。

## 結果および考察

### 1. 交雑結果

属間雑種の育成を目的として行った交雑試験の結果は、第1表の通りである。8組合せの内、ビワ‘茂木’×シャリンバイ‘Rha-1’，シャリンバイ‘Rha-1’×タイワンビワ‘De-1’，ニホンナシ‘幸水’×ビワ‘茂木’，およびビワ‘茂木’×ニホンナシ‘新水’の組合せで結果し、その結果率は、4.2% (3果)，25.0% (30果)，7.4% (9果) および6.2% (4果) であった。しかし、シャリンバイ‘Rha-1’×タイワンビワ‘De-1’，ニホンナシ‘幸水’×ビワ‘茂木’およびビワ‘茂木’×ニホンナシ‘新水’の交雑により結果した果実は、小果で健全なものはなく、種子もすべてしいなであったが、唯一、ビワ‘茂木’×シャリンバイ‘Rha-1’の交雑において、健全な果実と種子を獲得することがで

きた。ただし、ビワ‘茂木’×シャリンバイ‘Rha-1’の交雑での結果率は、4.2%と低く、品種間交雑の‘茂木’×‘長崎13号’の結果率88.0%と比べて著しく劣った。志村ら(1980)は、ニホンナシとリンゴの属間交雑による結果率は、16.9%~24.1%であったと報告しており、ビワを用いた属間交雑においても、品種間交雑と比べると結果率が低いことが明らかとなった。

## 2. 育成個体の形態的特徴および幼苗の生育

ビワ‘茂木’×シャリンバイ‘Rha-1’の組合せから得られた4個の種子を播種した結果、すべての個体が発芽した。雑種 No. 1, No. 3 および No. 4 の3個体は、葉面に光沢を発していることや葉脈の鮮明度が、シャリンバイ葉と似ていた(第1図)。きょ歯の角度や数は、両親が類似していることもあり、比較はできなかった。その3個体の幼植物は、数枚の本葉展開時まで生育を続けたが、漸次生育が鈍り、ついには発芽後4か月で枯死した。このような幼苗時における枯死現象は、ニホンナシとマルメロの属間雑種(志村ら, 1983)においても報告されており、ビワとシャリンバイの属間雑種においても同様の現象が起こったと考えられた。この原因については志村らの報告同様に不明である。一方、雑種 No. 2 の葉は、ビワ品種間交雑から得られた実生と同様の形態をしており、生育も良好だった。

## 3. SSRマーカーによる属間雑種の確認

リンゴ由来の8種類のSSRマーカーの内、5種類のSSR座(CH02b10, 02b1, CH01h01, CH02b03b, CH02f06)で、1本ないし2本の増幅断片が検出された(第2図)が、3種類のSSR座(28f4, CH01h10, CH01g12)については、増幅しなかった。すなわち、リンゴ由来の5種類のSSRマーカーが属を越えてビワおよびシャリンバイで利用が可能であった。増幅が確認された5種類のSSR座の内、ビワ

とシャリンバイ間で遺伝子型の違いが得られた4種類のSSRマーカー(CH02b10, 02b1, CH02b03b, CH01h01)を供試して親子関係を検討した。雑種 No. 1, No. 3 および No. 4 は、4種類のSSR座の対立遺伝子の1つが両親からその3個体に遺伝していた(第2表)。その結果、すべてのSSR座において対立遺伝子の遺伝に矛盾がなく、ビワ‘茂木’×シャリンバイ‘Rha-1’のF<sub>1</sub>雑種個体であると考えられた。このことから、ビワの属間雑種育成の可能性が示唆された。しかし、雑種 No. 2 については、‘茂木’のSSR対立遺伝子を遺伝しているが、シャリンバイのSSR対立遺伝子は遺伝していないので、自家受粉個体である可能性が高いと推定された。また、前項の葉の形態および生育に関する結果についてもこの結果を反映しているものと考えられた。

以上のようにビワとシャリンバイとの属間雑種による雑種の作出は可能であるが、それらは早期に生育異常を起こし、致死する確率が高いと思われる。従ってビワにおける属間雑種の組合せにおいて、生育の良い個体が出現した場合は、自家受粉個体である可能性があることを考えておかねばならない。本研究においてもSSRマーカーによる分析の結果、No. 2は属間雑種ではなかった。そのため雑種の判定は、DNAマーカーによって証明することが必要であると考えられた。

近年、*Prunus*属のシンテニー解析(Dirlewangerら, 2004)が盛んに行われている。リンゴで開発されたSSRマーカーは、ナシ亜科のマルメロ属やナシ属でも用いることができることと証明されている(Yamamotoら, 2001; Liebhardら, 2002)。さらにそれ以外のビワ属やシャリンバイ属においても利用可能であったことは、ナシ亜科果樹間のシンテニー解析においても有効に活用できることを示唆するものである。また、属間雑種を用いたナシ亜科のシンテニー解析が進めば、属を超えた交雑のメカニズムや属間雑種特有の枯死

現象の原因が明らかになる可能性があると思われた。

今回の属間交雑により、幼苗は獲得できたが長期間の育成はできなかった。今後は早期に枯死する幼苗の生存方法の検討を行い、新形質の獲得に努める必要があると考えられた。

## 摘 要

2001年および2002年にビワ属を中心にバラ科植物との交雑を行った。その結果、6組合せの内、4組合せで結果し、その結果率は4~25%であった。ビワ‘茂木’にシャリンバイの花粉を受粉した組合せにおいては、4.2%が結果し、4個の種子を得ることができた。さらに、その個体は、全てが発芽した。SSRマーカーによる親子鑑定を行ったところ、4個体中3個体がビワとシャリンバイとの属間雑種であると確認された。その3個体の葉の形態は、シャリンバイと似ていたが、すべての属間雑種確認個体は、4か月以内に枯死した。

## 引用文献

- Crane, M. B. and E. Markes. 1952. Pear-apple hybrids. *Nature* 170: 1017.
- Dirlewanger, E., E. Graziano, T. Joobeur, F. Garriga-Caldere, P. Cosson, W. Howad and P. Arus. 2004. Comparative mapping and marker-assisted selection in rosaceae fruit crops. *PNAS*. 101: 9891-9896.
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bul.* 19: 11-15.
- Gianfranceschi, L., N. Seglias, R. Tarchini, M. Komjanc and C. Gessler. 1998. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. *Theor. Appl. Genet.* 96: 1069-1076.
- Guilford, P., S. Prakash, J. M. Zhu, E. Rikkerink, S. Gardiner, H. Bassett and R. Forster. 1997. Microsatellites in *Malus × domestica* (apple)

: abundance, polymorphism and cultivar identification. *Theor. Appl. Genet.* 94: 249-254.

- Liebhard, R., L. Gianfranceschi, B. Koller, C. D. Ryder, R. Tarchini, E. Van De Weg and C. Gessler. 2002. Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Molecular Breeding*. 10: 217-241.
- 志村 勲・清家金嗣・宍倉豊光. 1980. ニホンナシ (*Pyrus serotium* Rehd.) とリンゴ (*Malus pumila* Mill.) の属間交雑. *育雑*. 30: 170-180.
- 志村 勲・伊藤祐司・清家金嗣. 1983. ニホンナシ (*Pyrus serotium* Rehd.) とマルメロ (*Cydonia oblonga* Mill.) との属間雑種. *園学雑*. 52: 243-249.
- 中尾 敬・寺井理治・橋本基之・一瀬 至・浅田謙介・松下由紀子・吉田俊雄. 1992. ビワのわい性台木の探索. 第1報 生育・収量・果実品質. 九農研. 第54号. 250.
- Weber, C. 1964. The genus chaenomeles (Rosaceae). *Journal of the Arnold Arboretum*. 45: 161-205.
- Yamamoto, T., T. kimura, Y. Sawamura, K. Kotobuki, Y. Ban, T. Hayashi and N. Matsuta. 2001. SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear. *Theor. Appl. Genet.* 102: 865-870.

Table 1. Setting of fruit and seed in crosses between loquat and other Rosaceae plants

Cross combination		No. of flowers	No. of fruits obtained	No. of seeds
Female	Male	pollinated	(percentage)	obtained
<i>E. japonica</i>	<i>R. indica</i>			
Mogi	Rha-1	72	3(4.2)	4
<i>R. indica</i>	<i>E. japonica</i>			
Rha-1	Mogi	116	0(0)	0
<i>R. indica</i>	<i>E. deflexa</i>			
Rha-1	De-1	120	30(25.0)	0
<i>P. pyrifolia</i>	<i>E. japonica</i>			
Kousui	Mogi	122	9(7.4)	0
<i>P. pyrifolia</i>	<i>E. japonica</i>			
Housui	Mogi	105	0(0)	0
<i>E. japonica</i>	<i>P. pyrifolia</i>			
Mogi	Shinsui	65	4(6.2)	0
<i>C. speciosa</i>	<i>E. japonica</i>			
Cha-1	Mogi	45	0(0)	0
<i>E. japonica</i>	<i>C. speciosa</i>			
Mogi	Cha-1	60	0(0)	0
-----				
<i>E. japonica</i>	<i>E. japonica</i>			
Mogi	Nagasaki No.13 <sup>z</sup>	142	125(88.0)	404

<sup>z</sup> F<sub>1</sub> of Nagasakiwase ×137-1 ( Champagne self )

Table 2. SSR genotypes of the hybrids and its parents

Cultivar	SSR marker (bp)				Results
	CH02b10	02b1	CH01h01	CH02b03b	
<i>E. japonica</i>					
Mogi	129/133 <sup>z</sup>	269/269	107/109	98/106	
<i>R. indica</i>					
Rha-1	126/126	250/255	125/125	75/77	
Hybrid					
No. 1	126/133	255/269	107/125	75/98	hybrid
No. 2	129/133	269/269	107/109	106/106	Not offspring of <i>R. indica</i>
No. 3	126/129	250/269	107/125	75/98	hybrid
No. 4	126/133	255/269	107/125	75/98	hybrid

<sup>z</sup> SSR alleles in bold and italic indicate alleles inherited from the female parent 'Mogi' and the male parent *R. indica*, respectively.



Fig. 1. Young leaves of loquat(A), *R. indica* (C) and their hybrid seedling No. 1(B).

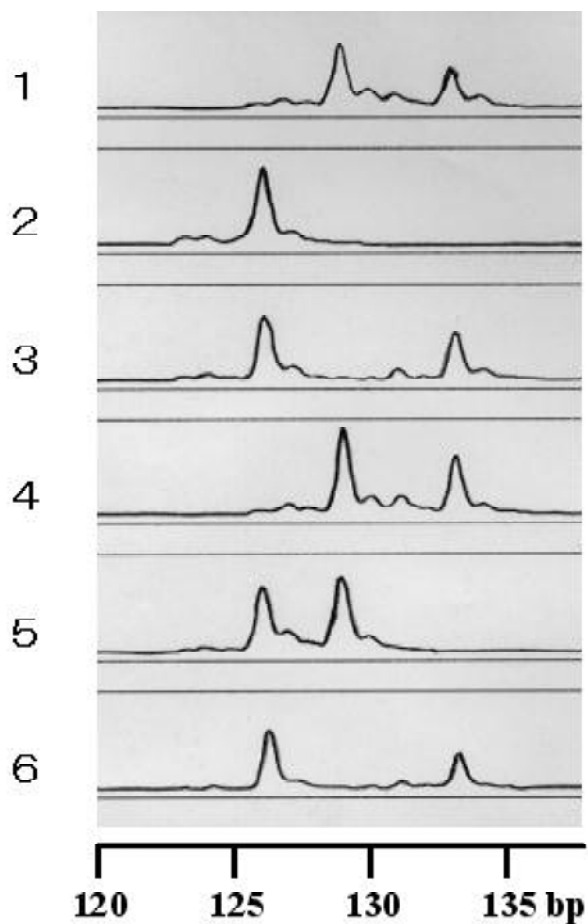


Fig. 2. Amplified fragment patterns of CH02B10 SSR from intergenetic hybridization plants. Lanes 1 to 6 show amplified products of the following varieties. lane 1: Mogi, lane 2: *R. indica*, lane 3: No. 1, lane 4: No. 2, lane 5: No. 3, lane 6: No. 4.

Bull. Nagasaki Fruit Tree Exp. Stn. 10:22-29. 2007.

## Possibility of Intergeneric Hybrids between Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) and Other *Rosaceae* Plants

Shinji FUKUDA, Toshiya YAMAMOTO, Yukiko TOMINAGA and Hirohisa NESUMI

*Nagasaki Fruit Tree Experiment Station, 1370 Onibashi-cho, Omura, Nagasaki, 856-0021, Japan*

### Summary

Intergeneric hybridizations were carried out between loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) and other *Rosaceae* plants in order to obtain the basic information on intergeneric hybrids. In 4 out of 8 crosses, 4-25% pollinated flowers bore fruits, however, 4 seeds were obtained from the cross of *E. japonica* cultivar 'Mogi' and *Rhaphiolepis indica*. Parentage of 4 individuals derived from an intergeneric cross of *E. japonica* × *R. indica*, was analyzed using 8 SSR (simple sequence repeat) markers. In 3 out of 4 individuals, the parent-offspring relationships were confirmed because the hybrids inherited SSR alleles from their parents without any discrepancy. Intergeneric hybrid seedlings showed similar leaf characters of *R. indica*. At the early stage, intergeneric hybrid seedlings died within 4 months after germination.