

胚培養によるカンキツの新品種育成試験 (第1報)

— 培養胚の生育に及ぼす糖類の影響 —

高柳りか 三浦泰昌 北浦健生 日高哲志*

Breeding of New Citrus Cultivars by Embryo Culture (No.1)
Effect of Saccharides on Embryo Growth *in vitro*

Rika TAKAYANAGI, Yasumasa MIURA, Takeo
KITAURA and Tetsushi HIDAKA*

緒 言

カンキツの輸入自由化の中で、本県のミカン農家の経営は極めて困難な状況におかれている。このような状況を打破するためには生産の一層の合理化を図ると共に、より高品質の新たな品種の開発が望まれている。そこで、カンキツ新品種の育成を目標に1989年より園芸試験場根府川分場と生物工学科の共同研究を開始した。

カンキツ類の中で栽培品種の多くは多胚性であるため交雑実生の獲得は困難であった。交雑胚を得るには、単胚性品種の利用、胚数の少ない品種の利用¹⁾、生育温度を上げることによる胚数の低下^{11,13~15)}等のほかに、珠心胚の生育が交雑胚よりも旺盛なことから、交雑胚が退化する前に未熟な胚を取り出して培養する、胚分離法がとられる。従来の研究結果⁴⁾では、成熟胚の発育は容易であるが、交雑胚の含まれている可能性の高い1mm以下の胚の発育は困難とされている。交雑親の一方がカラタチである場合は交雑胚の生育が旺盛であるが⁶⁾、一般的な栽培種間の組合せでは、1mm以下の小さな胚が交雑胚である可能性が高く、培養が困難である。

胚培養においてはスクロースを用いているのが一般的で、麦芽エキスやキュウリジュースを添加したMSやMTを基本とした培地が用いられてきた⁴⁾。一方、カンキツのカルスからの胚様体の誘導は糖の種類により制御できることが明らかになっているが³⁾、胚培養についての

報告は少ない。そこで、まず1mm以下の胚の培養にも適した培地の糖の種類や濃度についての検討を行った。

本試験を行うについては、農林水産省果樹試験場興津支場育種第2研究室室長大村三男博士に懇切な御指導をいただいた。記して感謝の意を表する。

材料及び方法

胚数の少ないナツミカン (*Citrus natsudaidai* Hayata) と胚数の多いポンカンタイプのインドの品種‘オレンジヒル’ (*C. reticulata* Blanco) の自然受粉した果実の胚を用いた。

1 胚の発育段階における糖の種類の影響

種子中の胚が肉眼で確認可能な時期から完全に成熟するまで4回にわたり、2週間毎に胚を摘出した。ナツミカンと‘オレンジヒル’とは果実の発育段階に時期的な差があるので、ナツミカンは、8月17日、8月31日、9月14日、9月28日に、‘オレンジヒル’は、9月14日、9月28日、10月12日、10月26日に採取した。

培地はMSにGA₃ 5 × 10⁻⁶M、スクロース、ラクトース、ガラクトースをそれぞれ0.1M添加し、pH5.6に調整した後、ゲルライト0.2%を加えて、オートクレーブで滅菌した。供試種子数は各品種20粒とし、試験管1本に種子1粒分の胚を個々に分けて置床した。培養条件は25°C、16時間日長とした。2mm以上の大ききで透明でない胚を成熟胚とし、2mm以上の大ききであっても透明な胚は未熟胚とした。置床後、1か月から1か月半後に1種子中

* 農林水産省果樹試験場興津支場

の胚の中から最大に生育した個体の草丈、根長、発根率、vitrification (ガラス質化) の発生率を測定した。

2 胚の生育に及ぼす糖の種類と濃度の影響

ナツミカンは9月1日(胚乳の大きさが種子の約3/4程度)、『オレンジヒル』は9月18日に採取した。

培地はMSにGA₃5×10⁻⁶Mを加え、スクロース、ラクトース、ガラクトース、グリセロール、マルトース、グルコースをそれぞれ0.05M、0.1M、0.2M添加した後、ゲルライト0.2%を添加してpH5.6に調整した。そのほかに糖無添加の区を設けた。20粒の種子から得られた胚を各培地に置床し、25°C、16時間日長で培養した。ナツミカンは1か月後、『オレンジヒル』は1か月半後に測定した。

結 果

1 胚の発育段階における糖の種類の影響

ナツミカンの胚は、8月17日、8月31日では胚乳は存在し、透明な未熟胚が観察されたが、9月14日、9月28日では胚乳がほとんど消失した成熟胚が観察された。『オレンジヒル』は9月14日、9月28日では胚乳が認められたが、10月12日、10月26日では胚乳は観察されなかった。胚数の多い『オレンジヒル』では、全段階において

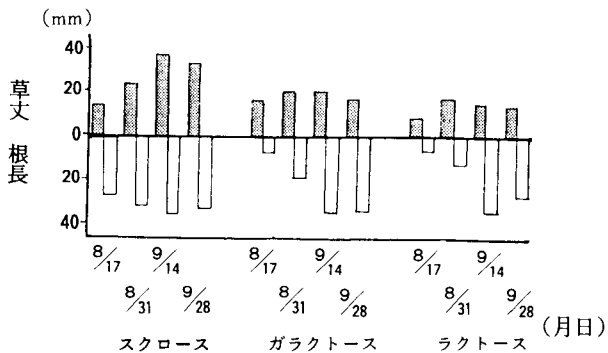
透明な未熟胚が観察された。

発育段階後期の成熟胚の生育は旺盛であったが、1mm以下の未熟胚は生育が劣った(第1,2図)。未熟胚における糖の影響をみると、スクロース区では太い茎と根をもつ正常な個体のほか、胚が生長することなく新たな胚を分化する二次胚や奇形、カルス化したものが観察された。ラクトースでは生育の全く認められない胚が多く観察され、分化した茎葉は葉色が薄く、vitrificationを伴う、もやし状の個体が多かった。ガラクトース区では茎の節間が伸長し、vitrificationが多数観察された。

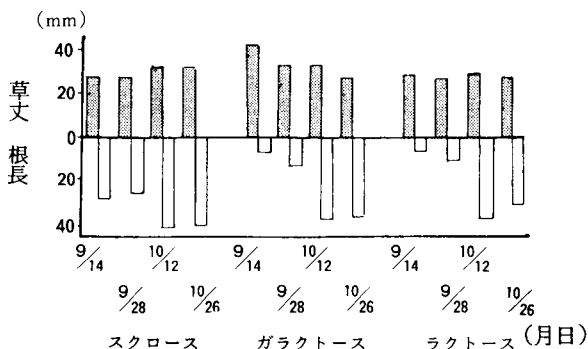
成熟胚の培養については、糖の種類による差はほとんど認められず、一定以上の大きさに成熟したものは、どの区においても旺盛な生育を示した。成熟するにしたがって発根率が上昇し、vitrificationの発生率は減少した(第3,4図)。

『オレンジヒル』とナツミカンの生育はほぼ同様の傾向を示したが、胚数が多く未熟胚の割合の高い『オレンジヒル』ではvitrificationが多数観察され、発根率も低かった。

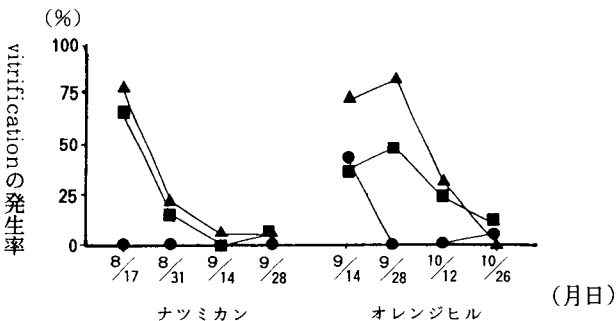
ナツミカンにおいて、置床時の胚数と培養後の個体数を比較したところ、培養後の個体数が増加していた(第1表)。



第1図 発育段階別の生育量 (ナツミカン)

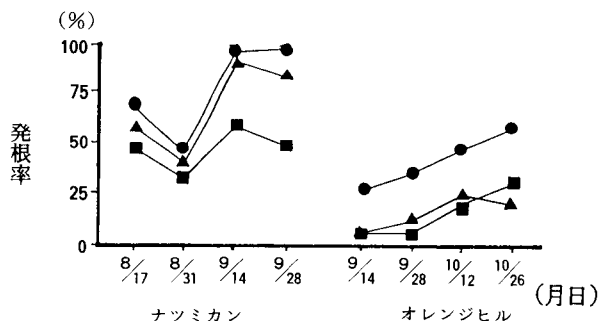


第2図 発育段階別の生育量 (オレンジヒル)



第3図 発育段階別のvitrificationの発生率

●スクロース ▲ガラクトース ■ラクトース



第4図 発育段階別の発根率

●スクロース ▲ガラクトース ■ラクトース

第1表 置床時の胚数と培養1か月後の個体数の比較

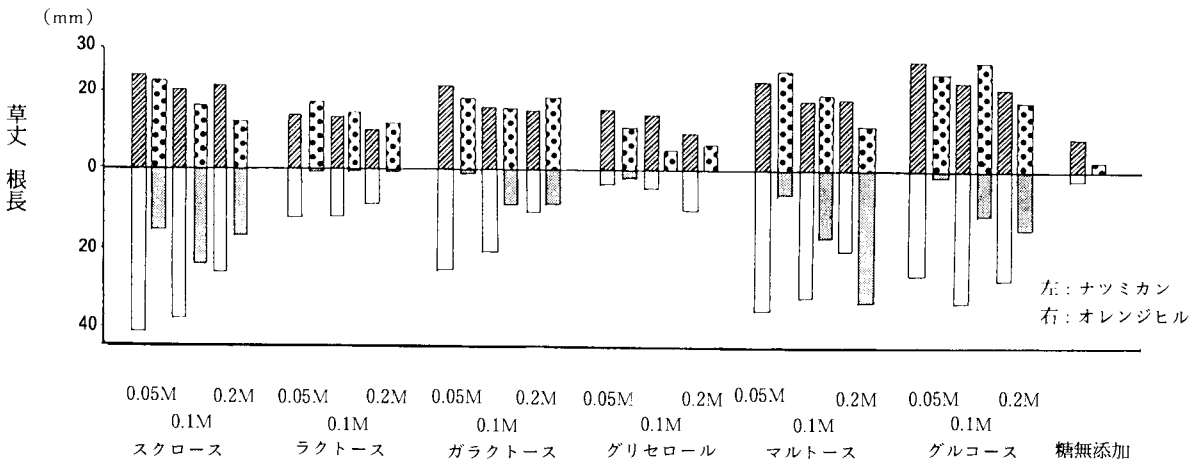
(ナツミカン 9月14日調査)

糖の種類	a 置床時の大きさ別胚数					b 生育個体数				
	0.1M	~1mm	1~2mm	2~5mm	5mm~	計	≥10mm	<10mm	計	b-a
スクロール		6	18	5	31	60	51	41	92	32
ラクトース		1	20	4	29	54	18	36	54	0
ガラクトース		4	11	2	33	50	35	22	57	7

第2表 培養後の1種子中に由来する個体数の採種時期別変化

供試品種	採種時期 (月 / 日)					
	8/17	8/31	9/14	9/28	10/12	10/26
ナツミカン	2.3	2.8	3.4	3.2	—	—
オレンジヒル	—	—	11.5	11.6	10.9	10.5

(60種子の平均)



第5図 茎葉と根の生育に及ぼす糖の種類と濃度の影響

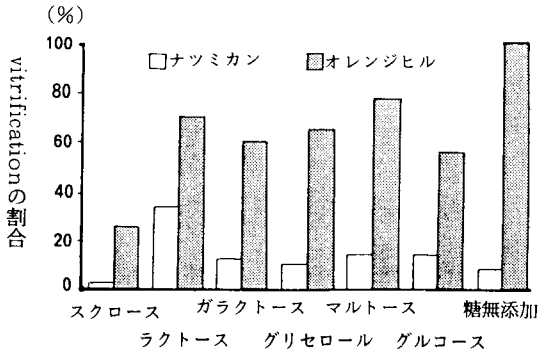
培養後の1種子に由来する個体数を胚の発育段階別にみると、ナツミカンでは、発育に従ってやや増加したが、成熟種子中の胚数(3~4個)とほとんど変わらなかった。しかし、「オレンジヒル」では、成熟種子中の胚数(未熟胚を含む)は30(20~40)前後であるが、培養後の個体数は10前後で著しく少なかった(第2表)。

2 胚の生育に及ぼす糖の種類と濃度の影響

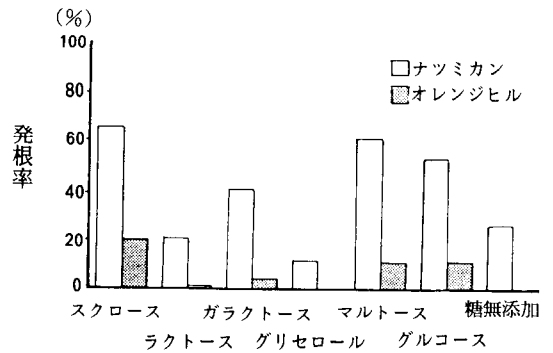
全体的に良好な生育を示したのは、マルトース、スクロース、グルコース区であったが、低濃度区では根が細長く、高濃度区の根は低濃度区に比較して顕著に太く、茎葉も根と同様の傾向を示した。またスクロース、マル

トース及びグルコースの0.2M区では、他区に比較して二次胚や奇形胚の発生率が高く、スクロース区ではカルス化が観察された。

一方、ガラクトース、ラクトース、グリセロール区及び糖無添加区は全濃度区において根が細く、発根が抑制されるとともに、vitrificationが発生した。茎葉の伸長もスクロース、マルトース、グルコース区に比較して劣った。しかし、ガラクトース区だけは節間伸長が著しく、生育の良好な前記三種類の糖添加区に次いで良好な生育を示した。ラクトース、グリセロール及び糖無添加区においては茎葉の生育が抑制された(第5図)。



第6図 胚の生育に及ぼす糖の種類の影響



第7図 胚の生育に及ぼす糖の種類の影響 (発根率)

‘オレンジヒル’と比較してナツミカンは発根率が良く、vitrificationの発生率は低かった(第6, 7図)。

ナツミカンにおいては9月1日の段階で肉眼観察による胚の大きさの割合は5mm以上34.5%, 1~5mm51.5%, 1mm以下14.1%であった。培養1か月後の個体数が置床時の胚数を上回った処理区が多かったが、グリセロール

区や糖無添加区は逆に減少した。増加率が最も高いのはグルコース区で20%増加し、最も低いのは、グリセロール区で3.6%であった(第3表)。

また、置床時に5mm以上の大きさの胚は1mm以下の胚よりも早く生育し、培養1か月後には10mm以上の大きさに達した。ただし、培養後の10mm以上の個体数は置床時

第3表 置床時の胚数と培養1か月後の個体数の比較 (ナツミカン)

糖の種類	濃度	置床時の胚数			a+b	培養1か月後の個体数			増加率 %	d-c*
		a(≥1mm)	b(<1mm)	c(≥5mm)		d(≥10mm)	e(<10mm)	d+e		
スクロース	0.05M	40	3	17	43	39	13	52	17.31	22
	0.1M	38	3	19	41	34	14	48	14.58	15
	0.2M	39	5	24	44	21	25	46	4.35	-3
ラクトース	0.05M	49	4	20	53	17	40	57	7.02	-3
	0.1M	48	19	13	67	14	64	78	14.10	1
	0.2M	37	9	15	46	8	44	52	11.54	-7
ガラクトース	0.05M	57	6	18	63	52	20	72	12.50	34
	0.1M	48	7	20	55	25	36	61	9.84	5
	0.2M	49	7	19	56	20	42	62	9.68	1
グリセロール	0.05M	47	11	21	58	24	36	60	3.33	3
	0.1M	47	3	23	50	21	34	55	9.09	-2
	0.2M	48	8	19	56	8	47	55	-1.82	-11
マルトース	0.05M	45	37	17	82	59	24	83	1.20	42
	0.1M	55	9	13	64	37	31	68	5.88	24
	0.2M	46	6	16	52	24	40	64	18.75	8
グルコース	0.05M	46	6	24	52	45	12	57	8.77	21
	0.1M	44	1	19	45	33	24	57	21.05	14
	0.2M	48	3	21	51	32	39	71	28.16	11
糖無添加		49	3	17	52	3	43	46	-13.04	-14

* d-c : 置床時に5mm以下であった胚が10mm以上に生育した数

第4表 草丈10mm以上に生育した個体数とその割合

(オレンジヒル)

糖の種類	濃度	草 丈		10mm以上の 割合 (%)
		≥10mm	<10mm	
スクロース	0.05M	69	133	34.2
	0.1M	26	182	12.5
	0.2M	13	196	6.2 (17.6)*
ラクトース	0.05M	53	128	29.3
	0.1M	25	112	18.2
	0.2M	10	172	5.5 (17.7)
ガラクトース	0.05M	62	92	40.7
	0.1M	32	86	27.1
	0.2M	39	117	25.0 (30.8)
グリセロール	0.05M	14	163	7.9
	0.1M	2	224	0.8
	0.2M	5	181	2.7 (3.8)
マルトース	0.05M	65	106	38.0
	0.1M	62	191	24.5
	0.2M	11	117	8.6 (23.7)
グルコース	0.05M	93	126	42.5
	0.1M	60	103	36.8
	0.2M	39	171	18.6 (32.6)
糖無添加		0	206	0

※ () 内の数字は各糖における莖葉長10mm以上の割合

に5mm以上の大きさの胚数を上回る区が多かった。(第3表 d-c)

‘オレンジヒル’では胚数が多く、細かいために置床時に胚数を計測することが困難で、記録できなかったが1か月培養後に10mm以上に生育した個体の割合はグルコース(32.6%)が最も高く、次いでガラクトース(30.8%)

が高かった。糖濃度が高くなるほどその割合が低下する傾向が認められた(第4表)。

ナツミカンでは草丈が10mm以上の個体はスクロースで63.8%、グルコース60.6%、マルトース54.3%と多く、次にガラクトース48.5%、グリセロール30.9%、ラクトース21.1%及び糖無添加区6.5%と少なかった。

各区の供試種子20粒中で、正常に発育できない奇形胚を形成した種子の割合は高濃度のスクロース、グルコース、ラクトースで高かった(第5表)。

第5表 糖の種類と濃度別の奇形胚の発生状況

糖の種類	糖濃度			平均 (%)
	0.05M	0.1M	0.2M	
スクロース	3	4	8	25.0
ラクトース	2	9	1	20.0
ガラクトース	2	2	1	8.3
グリセロール	0	0	1	1.7
マルトース	1	4	3	13.3
グルコース	0	3	10	21.7

(1区20種子)

考 察

成熟胚は糖の種類にかかわらず生育することが確かめられたが、未熟胚は培地中の糖の種類と濃度に大きな影響を受けた。特に‘オレンジヒル’は生育後期になっても新たに珠心胚が形成されるため未熟胚が多く、より大きな影響を受けたと考えられる。未熟胚の培養において、10mm以上に生育した個体の割合がガラクトース区で

高かったのは、ガラクトースが節間を伸長させたためであり、スクロースは節間伸長を抑える傾向が認められた。ガラクトース、グリセロール、ラクトース添加区では発根が抑制され、vitrificationの発生率も高かった。茎葉の伸長、根の太さ、葉色など全体的にバランスの良い生育を示したのは、マルトース、スクロース、グルコース添加区であった。しかし、0.05M濃度では根が細くなり、0.2M濃度では奇形や二次胚の形成率が上がるため、0.1Mが適当と考えられた。

vitrificationはカンキツの茎頂培養で観察されるが、ホルモンフリーの培地へ移植することにより回復する。胚培養した個体でもvitrificationを生じにくい培地に移植すると回復することから、実用上問題はないと考えられる。

これまで発育初期の微小な胚はスクロース、ガラクトース、ラクトース以外の糖で培養された報告はない。本試験の結果、成熟胚において良好な生育を示したマルトースやグルコースを用いてこれら微小な胚を培養し、検討する必要がある。

二次胚が形成されると茎葉の伸長が抑制され、胚は正常に発育しないことが多い。培養後の正常な個体数が置床した胚数を上回るという結果は1mm以下の不可視の胚が生育したためと考えられる。

草丈が10mm以上に生長した個体はそれ以後の生育が可能であると考えられ、培養後の10mm以上の個体数は置床時に5mm以上の大きさの胚数を上回る区が多かった。これは置床時に5mm以下であった胚が旺盛に生育したことを示しており、一方、個体数の減少した区では、第3表のd-cの値が大きいかほど小さな胚がよく生育したと考えられる。これらのことから、置床時の胚数と培養1か月後の個体数の増加率の高さはグルコースが最大であったが、小さな胚を大きく生長させる点からはスクロースやマルトースが適していると考えられる。ジャガイモやオオムギの薬培養においてマルトースが胚形成に効果的であるという報告¹²⁾もあり、カンキツの胚培養においてマルトースは胚の生育にも適していると考えられる。

すなわち、全体的に生育が良好であったマルトースがカンキツの胚培養に適していると考えられる。

摘 要

カンキツの交雑胚の培養系確立を目的に、胚の発育段階と培地中の糖の種類と濃度の関係について、小胚を中心に検討した。

1. 胚の生育段階別にスクロース、ガラクトース、ラクトース0.1Mの添加培地で培養したところ、成熟胚の生育はどの培地においても良好であったが、未熟胚はスクロース添加区で二次胚やカルスの形成率が高かった。一方、ガラクトース添加区では、発根は阻害されたが、節間の伸長が著しかった。

2. さらに、糖の種類をスクロース、ラクトース、ガラクトース、グリセロール、マルトース、グルコースに拡大し、その濃度を0.05M、0.1M、0.2Mとして培養したところ、スクロース、マルトース、グルコース添加区の0.1M濃度が生育に良好であった。一方、0.05M濃度では、細い根が生じ、0.2M濃度では二次胚やカルスが生じる傾向があった。

置床時の胚数と培養後の個体数との比較から、小胚の培養にはマルトースが好適と推測された。

引用文献

- 1) Batty, N. and J. Dunwell (1989) Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 18:221~226.
- 2) Finnie, S. J., W. Powell and A. F. Dyer (1989) Plant Breeding, 103:110~118.
- 3) 日高哲志・大村三男 (1989) 果樹試報. B, 16: 1~17
- 4) 堀内昭作・湯田英二・中川昌一 (1976) 園学雑., 45: 253~260
- 5) 堀内昭作 (1978) 育種学最近の進歩19, : 71~81.
- 6) 岩政昌男・上野 勇・西浦昌男 (1970) 園芸試報., B, 10: 7~16
- 7) Kochba, J., P. Spiegel-Roy and Hannah Safran (1972) Planta (Berl), 106:237~245.
- 8) 小林省蔵・池田 勇・中谷宗一 (1978) 園芸試報. E, 2: 9~24.
- 9) 小林省蔵・池田 勇・中谷宗一 (1979) 園学雑. 48 (2): 179~185.
- 10) 小林省蔵・池田 勇・中谷宗一 (1982) 果樹試報. E, 4: 21~27.
- 11) 中谷宗一・池田 勇・小林省蔵 (1978) 果樹試報. E, 2: 8~38.
- 12) 中谷宗一・池田 勇・小林省蔵 (1980) 果樹試報. E, 3: 15~23.
- 13) 中谷宗一・池田 勇・小林省蔵 (1982) 果樹試報. E, 4: 29~39.
- 14) 中谷宗一・池田 勇・小林省蔵 (1984) 果樹試報. E, 5: 29~34.

5 : 29~34.

15) 上野 勇・西村昌男(1969)園芸試報.B, 9 : 11~19

SUMMARY

In vitro culture of zygotic embryo in polyembryonic citrus is an important method in citrus breeding, however, it has been very difficult to regenerate plantlets from small (<1mm) embryos.

The experiments were conducted to clarify the effect of saccharides on *in vitro* development of citrus embryos.

1. Immature and mature embryos of Natsumikan (*Citrus natsudaidai* Hayata) and 'Orange Hill (*C. reticulata* Blanco)' were cultured on media containing sucrose, galactose or lactose, respectively. Immature embryos on the sucrose medium produced secondary embryos or callus at high rates. Many of those on the galactose medium regenerated shoots with elongated internodes, without roots.

On the other hand mature embryos grew normally on media used.

2. Embryos were cultured on media containing sucrose, lactose, galactose, glycerol, maltose or glucose at concentrations of 0.05M, 0.1M or 0.2M, respectively.

Generally, sucrose, maltose or glucose is effective for plantlet formation. Media containing 0.1M saccharides were effective for growing of immature embryoids. Poor roots were formed on media with 0.05M saccharides, and secondary embryos or callus were produced on the 0.2M saccharide media.

Judging from the number of regenerated plantlets to the number of embryos, maltose seemed to be the most effective for *in vitro* culture of citrus embryo.