

カラタチ珠心胚へのコルヒチン処理が四倍体植物誘導に及ぼす影響

乗原 実*・草野成夫

カンキツの主要台木であるカラタチの四倍体を効率的に育成するため、未熟種子からの珠心胚獲得法や珠心胚に対するコルヒチン処理条件について検討した。

カラタチ幼果内の未熟種子を麦芽抽出物500mg/Lを添加したMT培地を用いて25℃で培養すると、肥大した珠心胚が種皮を突き破り出現した。珠心胚の出現数は満開3ヶ月後の7月に採取した未熟種子が最も多く、1種子当たり10.8個であった。発生した胚は大きさ2mm未満のものが多かった。

0.1%コルヒチン処理における珠心胚の生存率は、2mm未満の胚に対する2日間処理で最も高く、2mm以上の胚の5日間および10日間処理ではすべて枯死した。コルヒチン処理による四倍体誘導率は、0.03%または0.1%の2日間処理で最も高く約20%であった。コルヒチン処理時の1ppmジベレリン(GA₃)加用は珠心胚の生存率向上に効果があったが、四倍体誘導率の向上には寄与しなかった。

[キーワード：倍数性育種, コルヒチン, カンキツ台木, カラタチ, 珠心胚]

Effect of Colchicine Treatment on Tetraploid Production of Nucellar Embryos in Trifoliolate Orange (*Poncirus trifoliata* Raf.) KUWAHARA Minoru and Nario KUSANO (Fukuoka Agricultural Research Center, Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan) *Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent.* 25:95-98(2006)

In vitro chromosome doubling of nucellar embryos in trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* Raf.) was investigated.

Nucellar embryos were gained through the cultivation of immature seeds in an MT medium containing 500mg/L malt extract. There was the largest number of appearances of nucellar embryos, when the immature seeds were extracted in July, with an outcome of 10.8 per seed. The size of the majority of the generated embryos was less than 2mm in diameter.

The survival probability of the embryos with a colchicine treatment was highest when embryos of less than 2 mm in diameter were used. Tetraploid plants were obtained from approximately 20% of the nucellar seedlings which had been treated with 0.03% or 0.1% colchicine for two days for the small embryos.

Although the addition of GA₃ to the colchicine treatment had an effect on improvement in the survival probability of the embryos, it did not contribute to increasing the percentages of chromosome doubling.

[Key words: chromosome doubling, colchicine, citrus rootstock, trifoliolate orange, nucellar embryo]

緒 言

カンキツ経営は、生産者の高齢化、品種や栽培技術の多様化により、低コスト、省力、軽労働化が求められており、対策の一つとして、わい性台木の利用による樹の小型化が推奨されている。しかし、有望なわい性台木はカラタチの変異系統‘ヒリュウ’のみで、樹勢の異なる多様なカンキツ品種に対して適切なわい化効果を発揮できない¹⁾。このため、わい化程度の異なる新たな台木の育成が求められている。

果樹では、染色体を倍加した台木がわい化能力を有する事例が報告されている。リンゴでは、Beakbane²⁾が四倍体キメラ台木は穂木に対してわい性台木と同等の樹勢抑制効果を示すことを、またブドウでは、本杉³⁾がコルヒチン処理により育成した数品種の四倍体台木は元の二倍体台木より穂木の樹勢を抑制することを報告している。カラタチでは、‘中葉系’⁴⁾および‘ルビドー’⁵⁾の2系統の実生から選抜された四倍体台木で穂木に対するわい化効果が認められている。しかし、それらの四倍体は実生中に出現する頻度が低い⁶⁾ため、実生からの選抜は効率的な手法とは言い難い。カラタチと近縁なカンキ

ツでは、カラタチ同様、実生中の四倍体の出現頻度が低い⁷⁾ため、人為的に倍数体植物を作出する手法として、未熟胚珠⁸⁾、成熟種子^{9,10)}へのコルヒチン処理や茎頂への処理と茎頂接ぎ木との併用¹¹⁾などが検討されてきた。しかし、カラタチでは四倍体の獲得は前述した実生からの選抜の報告があるだけで、コルヒチン処理等により人為的に四倍体を育成した事例は報告されていない。

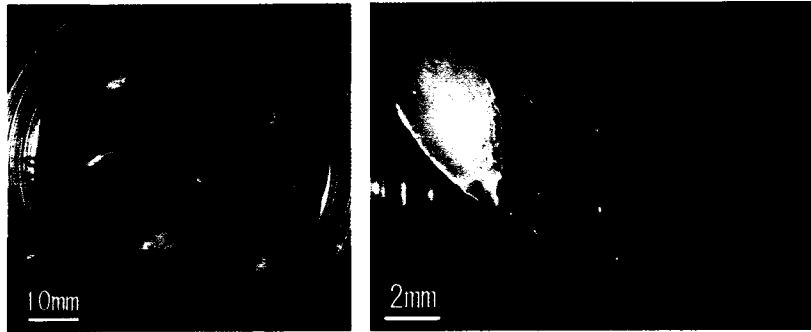
そこで本研究では、わい性台木を効率的に育成するため、カラタチの未熟種子からの珠心胚獲得法や出現する珠心胚へのコルヒチン処理条件が四倍体誘導に及ぼす影響について検討したので報告する。

材料および方法

1 未熟種子の採取時期と珠心胚出現数

2001年4月上旬に自然交雑した中葉系カラタチ(*Poncirus trifoliata* Raf., 2x) 果実を満開2, 3, 4, 5ヶ月後にあたる6月上旬, 7月上旬, 8月上旬, 9月上旬(以下, 6月, 7月, 8月, 9月)に採取し, 1.0%次亜塩素酸ナトリウム水溶液で滅菌後, 無菌的に未熟種子を摘出した。未熟種子は大量処理ができるよう無はく皮のまま, 麦芽抽出物500mg/L, ショ糖30g/L, 寒天7g/Lを添加した Murashige and Tucker 培地¹⁰⁾(以下, 基本培地)上に40~50個ずつ置床して

* 連絡責任者(果樹苗木分場)



第1図 未熟種子培養（左図，2001年6月下旬）と珠心胚の出現（右図，2001年7月上旬）

第1表 未熟種子の採取時期と珠心胚出現数¹⁾

採取時期	胚出現種子率 ²⁾ (%)	1 未熟種子(胚珠)当たりの長径(mm)別胚数 ³⁾				
		<2	2≤ <5	5≤ <10	10≤	合計
満開2ヶ月後(6月)	15	—	—	—	—	0.5
満開3ヶ月後(7月)	100	6.5	1.7	1.0	1.6	10.8
満開4ヶ月後(8月)	33	1.7	1.2	1.8	1.3	6.0
満開5ヶ月後(9月)	18	1.0	0.5	0.4	0.6	2.5

- 1) 2001年の結果，供試数は6，7，8月が40粒，9月が50粒
 2) 胚出現種子率=(胚出現した種子数/供試種子数)×100
 3) 調査は培養1ヶ月後(6月のみ2ヶ月後，大きさは未調査)

培養した。培養は，いずれも25℃，3000lx，16時間照明の条件下で行った（以下，培養はすべて同一条件で実施）。未熟種子は培養を行うと，肥大した胚が種皮を突き破り現れた。これを胚出現と呼ぶこととし，出現した胚のうち有色で魚雷型以上に発育して，容易に発芽するもののみを以下の試験に供した。それぞれの採取時期別に培養1ヶ月後に出現した胚数と長径を測定した。

2 珠心胚の大きさとコルヒチン処理期間が胚の生存率に及ぼす影響

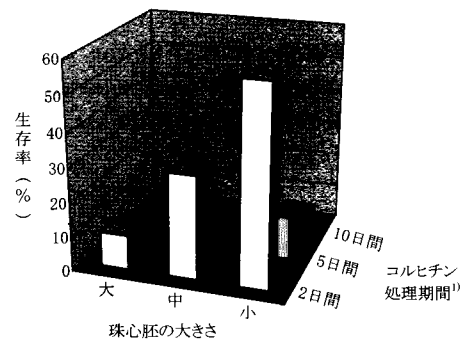
未熟種子を7月上旬に採取し10日間培養して得られた珠心胚は，大きさを小:長径2mm未満，中:2mm以上10mm未満，大:10mm以上に3区分し，大きさ別にコルヒチン処理期間が生存率に及ぼす影響を検討した。胚は，フィルター滅菌した0.1%コルヒチンを含む基本培地上に10~40個ずつ置床し，2，5，10日間培養した。その際，幼芽は培地に埋没させ，子葉はできるだけ培地に接触しないように置床した。コルヒチン処理後の胚は，コルヒチンを含まない基本培地で培養し，処理開始から2ヶ月後に生存率を調査した。

3 珠心胚のコルヒチン処理条件と四倍体誘導率

未熟種子を7月上旬に採取し10日間培養して得られた長径2mm未満の珠心胚を供試し，0.01，0.03，0.1%のコルヒチンおよび0.1%コルヒチン+1ppmジベレリン(GA₃)の4種を含む基本培地で2日間または5日間培養した。供試数は各区40個とした。コルヒチン処理後の胚は，コルヒチンを含まない基本培地で培養した。

コルヒチン処理4ヶ月後までに生存した個体はフローサイトメーター(パルテック社・PA)を用いてシュートの倍数性を解析した。長さ1cm程度のシュート先端約10mgを供試し，バッファーを加えて細かく刻んだ後，

50μmのメッシュでろ過し，DAPIで染色してフローサイトメーターにより蛍光強度を測定した。



第2図 珠心胚の大きさとコルヒチン処理期間が胚の生存率²⁾に及ぼす影響

- 1) コルヒチン処理は濃度0.1%で7月中旬実施
 2) 調査は処理開始2ヶ月後
 3) 供試数は各区大，中が10胚，小胚が40胚

結 果

1 未熟種子の採取時期と珠心胚出現数

未熟種子を基本培地上で培養すると，最短で培養2日後に，遅いものでもほぼ10日後には珠心胚が出現した（第1図）。第1表に未熟種子の採取時期と珠心胚出現数について示した。胚出現種子率は満開3ヶ月後の7月が100%と最も高く，8月，9月と採取時期が遅くなるにつれて減少した。1未熟種子から出現する胚数は採取時期によって異なり，7月が総計10.8個で最も多く，その後9月にかけて減少した。6月に採取した未熟種子(胚珠)は2ヶ月間培養したにもかかわらず，胚出現した種子数は低く，出現胚数は少なかった。培養1ヶ月後の胚の大きさは，2mm未満の小胚が多い傾向にあった。

第2表 珠心胚のコルヒチン処理濃度と期間が四倍体の誘導率に及ぼす影響

コルヒチン処理 ¹⁾		生存 個体数 ²⁾	生存個体の倍数性		
濃度	期間		二倍体	キメラ	四倍体
%	日	個(%) ³⁾	個	個	個(%) ³⁾
0	2	40 (100)	-	-	-
0.01	2	22 (55)	11	8	3 (8)
0.03	2	25 (63)	9	7	9 (23)
0.1	2	19 (48)	8	3	8 (20)
0.1+GA	2	31 (78)	13	12	6 (15)

0	5	40 (100)	-	-	-
0.01	5	5 (13)	1	0	4 (10)
0.03	5	1 (3)	1	0	0 (0)
0.1	5	0 (0)	0	0	0 (0)
0.1+GA	5	5 (13)	1	3	1 (3)

1) 2001年7月中旬に長径2mm未満の珠心胚を40個供試

2) 調査はコルヒチン処理4ヶ月後

3) 供試個体数に対する割合

2 珠心胚の大きさとコルヒチン処理期間が胚の生存率に及ぼす影響

第2図に珠心胚の大きさと0.1%コルヒチン処理期間が胚の生存率に及ぼす影響について示した。珠心胚の生存率は胚が小さいほど、また、コルヒチン処理期間が短いほど高く、小胚の2日間処理では57.5%と特に高かった。大きさが大、中、すなわち長径2mm以上の胚はコルヒチン処理期間5、10日では発芽せず、すべて枯死した。

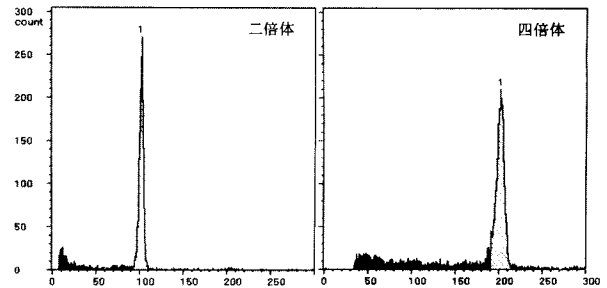
3 珠心胚のコルヒチン処理条件と四倍体誘導率

第2表に珠心胚のコルヒチン処理の濃度と期間が四倍体の誘導率に及ぼす影響について示した。2mm未満の珠心胚の生存個体数は、コルヒチン処理濃度0.1%単独処理で少なかったが、0.1%+GAが最も多かった。処理期間では処理2日間の生存率が5日間より高かった。

培養4ヶ月後まで生存した個体は、フローサイトメーターで倍数性を解析した結果、二倍体、四倍体および二倍体と四倍体の細胞キメラ個体が確認された(第3図, 第2表)。四倍体個体はコルヒチン2日間処理で多く、5日間で少なかった。コルヒチン2日間処理では、濃度0.03、0.1%で四倍体個体が多く、供試数に対する割合も高かった。一方、5日間処理では、0.01%で四倍体が多かった。

考 察

カンキツでは、コルヒチン処理の材料として、主に成熟種子由来の珠心胚が用いられてきた^{6,16)}。カラタチはカンキツと同様に、同一種子に受精胚とともに種子親の珠心組織から無性的に発生した珠心胚を含む、いわゆる多胚現象を示す。しかし、カラタチは1種子当たり胚数が4.98でカンキツに比べて少なく、しかも微小な胚が多いため、播種した後に発芽する胚は1~2個に限られる¹⁵⁾。多胚性のカンキツ‘トロピタオレンジ’では、成熟種子の胚数は平均19.7であるが、受粉50日後の胚珠(未熟種子)を培養すると1粒当たり20~40個と、より多くの胚が出現すること⁷⁾が知られている。カラタチでも今回、未熟種子培養で最大10.8個の胚が得られたこと(第1表)は、四倍体を育成するに当たり、コルヒチン処理に



第3図 フローサイトメーターによるコルヒチン処理生存個体の倍数性解析

用いる材料を効率的に確保する手法といえる。

鈴木・小中原¹³⁾はカラタチ種子の採取時期およびはく皮と発芽率との関係について調査し、発芽能力は7月中旬から認められるものの、8月中旬以降は種皮の不透過性が原因で無はく皮では発芽率が低下することを報告している。今回の未熟種子培養においても、胚出現した種子数率および胚出現数は採取時期によって差が認められ、両者とも7月が最も多く、採取時期が遅くなるにつれて減少し(第1表)、これらは種皮の発達によって胚出現が抑制されたものであると考えられた。さらに、0.1%コルヒチン処理後の生存率が高い2mm未満の小胚の出現数も7月に多かったこと(第1表)から、効率よく胚を獲得できる未熟種子の採取時期は7月が最適といえる。

カンキツに対するコルヒチン処理については、濃度が高いほど、あるいは処理期間が長くなるほど処理部位の枯死率が高くなること¹²⁾が指摘されている。カラタチの珠心胚はコルヒチンを2日間単独処理した場合、最高濃度の0.1%で最も生存率が低く、処理5日間では全個体が枯死するなど、カンキツと同様の結果が得られた(第2表)。しかし、0.1%の2日間処理では生存個体に対する四倍体獲得率が最も高く(42%)、供試胚数に対する四倍体獲得率は20%と0.03%処理の23%(対生存個体数比36%)とほとんど差がなかった(第2表)。このことから、今回試験した処理濃度範囲では0.03%または0.1%、2日間処理がカラタチ四倍体を獲得するための最適コルヒチン処理条件と考えられる。一方、胚が小さいほどコルヒチン処理後の生存率が高かった(第2

図) 要因として、無処理の培地上では大きさにかかわらずほとんど胚が発芽し生育したこと(栗原, 未発表)から、胚の発育段階におけるコルヒチン感受性の差異やコルヒチン吸収量の違いなどが考えられるが、現在のところ未解明であり、今後の検討課題である。

従来のカラタチ実生中に出現する四倍体個体の選抜による獲得率1.5%¹⁾に比べて、本研究で行った未熟種子中の小胚に対するコルヒチン処理法では、かなりの高率で四倍体を誘導できた。カンキツでは、キンカンの成熟種子に対する0.05%、48時間のコルヒチン処理で50%の四倍体が見られた事例や¹⁶⁾、カボスの成熟種子に対する0.2%、24時間処理で45.5%の四倍体が見られた事例⁶⁾が報告されている。今回のカラタチでは、供試個体に対する四倍体誘導率は約20%であったが、上記2例の報告と同様に倍数性解析調査個体数当たりの誘導率に換算すると、誘導率は約40%であり、カンキツの結果とほぼ同等の誘導率であったといえる。

コルヒチンは分裂中の細胞に対して作用するが、その際ショ糖やジベレリンの添加がコルヒチン処理の効果を増大させること¹²⁾が明らかにされている。今回、四倍体獲得率を向上させる試みとして1ppmジベレリン(GA₃)を加用したが、カラタチ珠心胚の発芽促進(栗原, 未発表)や生存率向上の効果は認められたものの、四倍体誘導率の向上には寄与しなかった(第2表)。

今回得られた四倍体個体は、わい化効果の評価が残されており、この点について個体およびカンキツ接ぎ木苗の生育、果実品質等の調査を進める必要がある。また、今回確立した四倍体誘導法は、わい化程度の多様性を図るため、「ヒリュウ」、小葉系、USDA等のカラタチの他系統への応用が期待される。

引用文献

- 1) Beakbane, A. B. (1967) The dwarfing effect of a tetraploid sport of M.X III apple rootstock. Ann. Rep. E. Malling Res. Sta. 1966: 96-97.
- 2) Frost, H. B. (1925) Tetraploidy in citrus. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 11: 535-537.
- 3) Gmitter, F. G., Jr. and X.Ling (1991) Embryogenesis in vitro and nonchimeric tetraploid plant recovery from undeveloped citrus ovules treated with colchicine. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 116(2): 317-321.
- 4) 岩佐俊吉・白石真一 (1957) 枳殻に関する研究(第1報) カラタチの系統について. 園研集録 8: 59-63.
- 5) 岩崎藤助・西浦昌男 (1963) 4倍体, 大葉系および小葉系カラタチについて. 第2報 実生の発育と台木としての価値. 園試報B2: 15-24.
- 6) 上曾山 茂・佐保 学・國武久登 (2000) コルヒチン処理によるカボス4倍体の作出. 九農研62: 227.
- 7) 小林省蔵・池田 勇・中谷宗一 (1978) カンキツ類の珠心胚形成に関する研究. I 珠心胚形成と胚珠の発育. 果樹試報E2: 9-24.
- 8) Lee, L. S. (1988) Citrus polyploidy—Origins and potential for cultivar improvement. Aust. J. Agric. Res. 39: 735-747.
- 9) 本杉日野 (2002) 倍数性ブドウ台木の育成に関する研究—特に樹勢制御台木の育成について—. 京都大学学位論文: 1-133.
- 10) Murashige, T. and D. P. H. Tucker. (1969) Growth factor requirements of citrus tissue culture. In: Proc. First Int. Citrus Symp. Vol. 3 (H. D. Chapman, ed.), University of California, Riverside, pp. 1155-1161.
- 11) 生山 巖 (1992) カンキツ類の倍数性育種に関する研究—主として四倍性育種素材の作出について—. 果樹試報・特報 3: 1-68.
- 12) Sanford, J. C. (1983) Ploidy manipulations. In: Methods in Fruit Breeding. (Moore, J. N. and Janick, J. eds.), Purdue University Press, Indiana, pp. 100-123.
- 13) 鈴木 富・小中原 実 (1985) カンキツの早期大苗育成技術の改善. 第1報 カラタチ台木の早期育成法. 静岡柑試研報21: 9-18.
- 14) 高原利雄・緒方達志・河瀬憲次・岩垣 功・村松昇・小野祐幸・吉永勝一・廣瀬和榮・山田彬雄・高辻豊二・内田 誠 (1994) 大谷伊予柑の生育と果実品質に及ぼす各種台木の影響. 果樹試報26: 36-60.
- 15) 上野 勇・岩政正男・西浦昌男 (1967) カンキツ属および近縁属品種の胚数. 園試報B7: 11-21.
- 16) 八幡昌紀・柏原夕希子・黒木宏憲・國武久登・小松春喜 (2004) ニンボウキンカン種子へのコルヒチンおよびオリザリン処理が四倍体植物誘導に及ぼす影響. 園学研 3: 11-16.