

カラタチの苗条原基誘導と植物体の再生

堀江裕一郎, 鶴 丈和, 野口保弘¹⁾

カラタチを大量に増殖する技術確立するため, カラタチの苗条原基の誘導と苗条原基から植物体への再生条件を明らかにした。試験は温度 25℃, 照度 5,000Lux, 16 時間日長条件下で行った。

カラタチの苗条原基は, 不定芽を含む胚軸カルス及び基頂を外植体として, ナフタレン酢酸 (以下 NAA と略) 0.1mg/l, N-(2-クロロ-4-ピリジル)-N'-フェニル尿素 (以下 4PU と略) 2.0mg/l, ショ糖 50g/l を添加した WP 液体培地で振とう培養すると誘導できた。これら苗条原基は, 誘導培地と同じ組成の培地を 1 カ月間隔で交換すると継代増殖できた。さらに苗条原基は, NAA 0.02mg/l, 4PU 0.2mg/l, ショ糖 15g/l を添加した NN 寒天培地に移植することにより容易に植物体を再生した。

[キーワード: カラタチ, 苗条原基, 再生, 大量増殖]

Induction of Trifoliate Orange Shoot Primordia and Regeneration of Plantlets. HORIE Yuichiro, Takekazu TSURU and Yasuhiro NOGUCHI (Fukuoka Agric. Res. Cent., Chikushino, Fukuoka 818, Japan) *Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent.* 14: 167-170 (1995)

To establish mass propagation system of trifoliate orange, we developed a method. Experimental conditions were 25℃, 16L: 8D photoperiodic regime of 5,000Lux. Shoot primordia were induced from adventitious bud with the callus hypocotyl and shoot apex by shaking culture on the WP medium containing 0.1mg/l α -naphthaleneacetic acid (NAA), 2.0mg/l N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenyl-urea (4PU) and 50g/l sucrose. Thereafter, the shoot primordia were multiplied by exchanging the medium at an interval of 1 month. Plantlets were easily regenerated from these shoot primordia after transferring to the NN agar medium containing 0.02mg/l NAA, 0.2mg/l 4PU and 15g/l sucrose.

[Key words: Trifoliate orange, Shoot primordia, Regeneration, Mass propagation]

結 言

カラタチは耐寒性が強く, カラタチ台の樹は他の台木品種に比較してわい化するため作業性に優れる。また, 結果期に達するのが早く, 豊産性で果実品質も良い²⁾ため我が国の主要なカンキツ台木として利用されている。

カラタチの種子のほとんどは多胚性であるため, カキやナシといった他の果樹台木より均一な実生苗を得ることが可能である。しかし, 有性胚由来の実生が混ざると, 大葉, 小葉等の変異個体が生じる。近年カラタチの系統の中でも極わい性台木として注目され利用が増えている 'ヒリュウ' は自家受粉より生じた個体群に, 有性胚実生が 47% と高い割合で含まれていることが報告されている¹⁾。今後, 'ヒリュウ' のような系統で均一な台木を育成するには, 種子繁殖でなく栄養繁殖に頼らざるを得ない。

栄養繁殖には挿し木, 組織培養による方法があるが, 挿し木は実用化しやすいものの穂木を採取する母樹の確保が必要であり, また母樹の樹齢が進むと発根能力が劣弱することが報告されている⁶⁾。一方, 組織培養は施設整備が必要であるが, 挿し木に比較して増殖効率が高く, 一度培養系に取り込むと周年供給が可能である等の利点があり, 今後重要な繁殖法になることが予想される。一般に, 組織培養によるクローン苗の増殖には早生分枝, 胚様体, カルス, 苗条原基が用いられている¹⁰⁾。カラタチについては, 草野ら³⁾が胚軸由来のカルスからの不定芽を利用した増殖法を, 原田ら¹⁾が胚珠由来のカルスからの不定芽分化の制御法を報告している。しかし, カルスからの不定芽を利用した方法は, 増殖効率が十分でなく継代操作に労力がかか

る等の問題がある。

一方, 苗条原基は田中ら⁹⁾が 1983 年にキク科のハプロパプスを用いて開発したクローン苗の大量増殖法である。苗条原基は, 長期間の継代培養においても染色体的に安定で, 植物体への再生が容易であり, 大量増殖能に優れるため, 多くの野菜や花きで誘導が報告されている¹⁰⁾。しかし, カラタチの苗条原基の誘導についての報告は全くない。本報では, カラタチの苗条原基の誘導と植物体への再生条件について検討したので報告する。

材料及び方法

1 カラタチの胚軸からの苗条原基の誘導条件

カラタチの種子を塩化ベンザルコニウム 0.1% 溶液で 5 分間, 8 ヒドロキシキノリン硫酸塩 1.0% 溶液で 10 分間滅菌し, クリーンベンチ内で表皮, 内皮を剥皮後, 有効塩素濃度 0.1% の次亜塩素酸ナトリウム溶液に 1 分間浸漬した。さらに, 滅菌水で洗浄後, ショ糖 50g/l と寒天 8g/l を添加し, pH5.8 に調整した MT⁷⁾培地に無菌的に播種した。

約 1 カ月後, 緑化伸長した胚軸を約 2~3 mm の長さに切断し, 草野ら³⁾の方法のうち, オーキシンの種類をナフタレン酢酸 (以下 NAA と略) から 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (以下 2,4-D と略) 0.1mg/l に変えた MT 培地で培養した。約 40 日後に得られた表面に不定芽を含む胚軸カルスを, 苗条原基の誘導の外植体とした。1 区 5~8 個の外植体を供試し, 第 1 表に示した基本培地, 植物ホルモン及び培養方法が苗条原基の誘導に及ぼす影響を検討した。なお, 供試培地にはいずれも ショ糖 50g/l を添加した。また, 液体培地については 7~10 日間隔で培地を交換し

1) 現福岡県病害虫防除所

第1表 培養条件がカラタチの苗条原基の誘導に及ぼす影響

基本培地	植物ホルモン (mg/l)				寒天	振とう速度	外植体数	苗条原基 様数 ¹⁾	植物体再 生数
	NAA	2,4-D	4PU	BA					
WP	0.1	— ²⁾	2.0	—	g/l	回/分	個	個	個
1/2MT	0.1	—	2.0	—	—	60	5	10	4
MT	0.1	—	—	5.0	—	60	6	6	0
MT	—	0.1	—	5.0	—	60	6	0	0
MT	—	—	—	—	8.0	0	8	0	0

1) 集塊の表面に粒状の突起を生じている個体。

2) 無添加を示す。

た。培養の条件は、照度 5,000Lux, 16 時間日長, 温度 25℃ とした。

苗条原基の誘導を始めて 50 日後, 各試験区の培養物を NAA 0.1mg/l, 6-ベンジルアデニン (以下 BA と略) 5.0mg/l, アデニン 40mg/l, 麦芽エキス 500mg/l, ショ糖 50g/l, 寒天 8 g/l を添加し, pH5.8 に調整した MT 培地に移植し, 植物体の再生状況を調査した。

2 外植体の種類が苗条原基の誘導に及ぼす影響

茎頂, 微小カルス及び胚軸カルスを外植体とした場合, これらが苗条原基の誘導に及ぼす影響を検討した。カラタチの伸長中の新梢を塩化ベンザルコニウム 0.1% 溶液で 5 分間, 有効塩素 0.1% の濃度の次亜塩素酸ナトリウム溶液で 10 分間滅菌後, 滅菌水で洗浄したのち, クリーンベンチ内で約 0.2~0.3mm の大きさに茎頂を摘出し, 外植体とした。また 0.5~0.8g 程度の重さのカルス化した胚軸を, 目の大きさ約 2 mm のステンレスメッシュで裏ごしして得られた 1~2 mm の大きさの微小カルス及びステンレスメッシュ上に残った胚軸カルスを外植体とした。培養の条件は, 1 の結果から NAA 0.1mg/l, N-(2-クロロ-4-ピリジル)-N'-フェニル尿素 (以下 4 PU と略) 2.0 mg/l, ショ糖 50g/l を添加した WP⁵⁾ 培地とし, 毎分 60 回の水平振とうとした。微小カルスと胚軸カルスについては培養 50 日後に, 茎頂については培養 90 日後に, 苗条原基の誘導数と大きさを調査した。

3 ショ糖濃度が植物体の再生に及ぼす影響

誘導培地で胚軸カルスから誘導された苗条原基を, 同培地で 1 カ月間隔で継代した。4 回継代後の約 2 mm の大きさの苗条原基を 1 区 6 個供試し, ショ糖濃度を 0, 15, 30, 50 g/l に調整し, 寒天を 8g/l 添加し, pH5.8 に調整した WP 培地にそれぞれ置床した。培養 40 日後に, ショ糖濃度が苗条原基からの植物体の再生に及ぼす影響を調査した。

4 基本培地と植物ホルモンが植物体の再生に及ぼす影響

3 と同様に継代している大きさ約 2 mm の苗条原基を 1 区 36~66 個供試し, 基本培地と植物ホルモンが植物体再生に及ぼす影響を検討した。基本培地の種類として WP, NN⁸⁾ 及び MT の 3 種, オーキシンの種類として 0.02mg/l の 2,4-D と NAA, 及び 0.002mg/l の 5,6-clo₂IAA メチルエステル (日本化薬株式会社より分譲を受けた。以下 NK-828 メチルと略) の 3 種, サイトカイニンの種類として 0.2mg/l の濃度の BA, カイネチン及び 4 PU の 3 種を組み合わせて第 4 表のように 9 種類の培地を設定した。3 の結果を受けて, 各区とも ショ糖濃度は 15g/l, 寒天は 8g/l とし, pH5.8 に調整した。培地に置床して 50 日

後に植物体への再生率, 伸長した茎葉数を調査した。

結果及び考察

1 カラタチの胚軸からの苗条原基の誘導条件

カラタチの胚軸カルスからの苗条原基の誘導条件を検討した結果を第 1 表に示した。胚軸カルスからは培養開始約 50 日後に, WP, 1/2 MT 培地で淡黄色のコンペイトウ状の集塊が得られた。WP 培地で得られた集塊は 1/2 MT 培地の集塊に比較して表面の粒状の突起が小さく, ピンセットなどで触れると容易に分離した。MT 培地では寒天の有無に関わらず粒状の突起が見られることなく褐変枯死した。得られた WP, 1/2 MT 培地の集塊を, MT 寒天培地に置床すると, WP 培地の集塊からは植物体が再生したが, 1/2 MT 培地の集塊は植物体を再生しないまま褐変枯死した。以上の結果から, カラタチの苗条原基は胚軸カルスを, NAA 0.1mg/l, 4 PU 2.0mg/l, ショ糖 50g/l を添加した WP 培地で振とう培養すると, 50 日程度で誘導できることが明らかになった。

2 外植体の種類が苗条原基の誘導に及ぼす影響

外植体が苗条原基の誘導に及ぼす影響を第 2 表に示した。胚軸カルス及び微小カルスを外植体とした場合は, 50 日後に苗条原基が誘導された。一方, 茎頂を外植体とした場合は, 苗条原基の誘導に 90 日もの長期間を要した。胚軸 1 個当たりの苗条原基の誘導数は, 微小カルスからが 23.9 個と最も多く, 次いで胚軸カルスからであった。一方, 茎頂は枯死する個体があったため, 供試数当たり 0.3 個と最も少なかった。以上の結果から, 外植体の違いにより誘導された苗条原基の数や大きさに差はあるものの, いずれの外植体からも苗条原基が誘導されることが明らかになった。苗条原基は, 葉原基 2~3 枚をつけた茎頂を外植体とした場合に誘導される報告が多い¹⁰⁾ が, カラタチの場合は茎頂だけでなく, 胚軸カルスからも効率良く誘導できた。これは胚軸カルスの表面で分化しつつある多数の不定芽が, 液体振とう培養することにより極性を失い, 第 1 図に示したように, 不定芽の生長点が苗条原基化したことによるものと考えられる。また, ステンレスメッシュで裏ごしした微小カルスから苗条原基が誘導されたのは, この中に既に分化した不定芽が存在したためと考えられる。

胚軸カルス, 微小カルス, 茎頂から誘導された苗条原基はいずれも振とう培養により粒状の突起を形成し, 第 2 図-①に示されるように大きさ 10mm 以下の集塊に分離しながら増殖した。振とう培養中は葉や根といった器官への分化は認められなかった。また, 苗条原基の組織切片を観

察した結果、第2図-②に示されるような表層の密な細胞と内層のやや大きめの細胞の二層構造が認められた。苗条原基は、寒天培地に置床すると植物体へ再生はするが、根の分化はみられず、第2図-③のように苗条1極性の分化形態を示した。

誘導した苗条原基は、NAA 0.1mg/l、4PU 2.0mg/l、ショ糖 50g/l を添加したWP培地で振とう培養し、1カ月ごとに培地交換すると継代できる。最初に誘導した苗条原基は2年間経過した現在でも、植物体への再生能力を維持し増殖している。長期にわたる苗条原基の維持には継代時に淡黄色～黄緑色を呈し、表面の粒状の突起がはっきりと観察できる集塊を移植することが必要である。

3 ショ糖濃度が植物体の再生に及ぼす影響

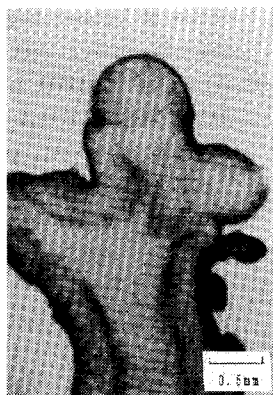
苗条原基からの植物体再生に及ぼすショ糖濃度の影響を第3表に示した。苗条原基を各培地に置床して40日培養

第2表 外植体の種類が苗条原基の誘導に及ぼす影響

外植体	誘導期間	苗条原基誘導数 / 供試数	苗条原基の大きさ
	日	個	mm
茎頂	90	3 / 10	2
微小カルス	50	23.9 / 1 胚軸	1 ~ 2
胚軸カルス	50	8 / 8	7 ~ 10

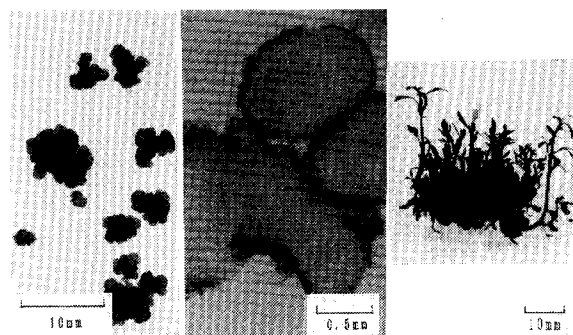


①胚軸カルス表面の不定芽
(胚軸切片を培地に置床
約40日後)



②胚軸カルス表面の不定芽の
苗条原基化
(①の個体を振とう培養
約30日後)

第1図 カラタチの胚軸カルスの不定芽からの
苗条原基の誘導



①分裂増殖中の苗条原基 ②苗条原基の組織構造 ③植物体への再生

第2図 カラタチの苗条原基と植物体の再生

後、ショ糖濃度 15、30g/l の区では植物体の再生が見られたが、0、50g/l の区では再生が観察されなかった。以上の結果から、苗条原基からの植物体再生に効果的なショ糖濃度は、植物体への再生数、発生した茎葉数から判断して 15g/l と考えられる。

4 基本培地と植物ホルモンが植物体の再生に及ぼす影響

基本培地、植物ホルモンの種類が苗条原基からの植物体再生に与える影響を検討した結果を第4表に示した。さらに、再生率、茎葉数を外的基準として、基本培地、オーキシン、サイトカイニンを変因として、数量化I類により統計処理した。苗条原基からの植物体再生で、再生率に対する各変因の影響は小さく、処理区間での差は認められなかった。茎葉数については第5表に示したように各変因の影響が大きかった。茎葉数増加への影響の大きかった変因は基本培地とサイトカイニンで、オーキシンは小さかった。付与係数から判断して、苗条原基からの茎葉増殖に最も効果のある基本培地と植物ホルモンの組み合わせは、基本培地をNN、オーキシンをNAA、サイトカイニンを4PUにすると良いことが明らかになった。

筆者らは、本報でその誘導条件、植物体の再生条件を明らかにしたカラタチの苗条原基を利用し、組織培養によるカンキツ台木の実用化技術確立に取り組んでいる。台木を育成するうえで問題になる遺伝的変異についてみると、特に胚軸カルスから誘導した苗条原基は、種子を起源としているため種子の段階での変異の有無を確認する必要がある。現在は、苗条原基誘導のために胚軸カルスを誘導する

第3表 植物体再生に及ぼすショ糖濃度の影響

ショ糖濃度	再生数 ¹⁾	平均茎葉数	平均茎葉長
g/l	個	本	mm
0	0 / 6	0	0
15	5 / 6	2.5	4.5
30	3 / 6	1.5	5.2
50	0 / 6	0	0

1) 苗条原基の(再生数/供試数)を示す。

第4表 植物体再生に及ぼす基本培地と
植物ホルモンの影響

基本培地	オーキシン	サイトカイニン	供試数	再生率	茎葉数 ¹⁾
			個	%	本
WP	NK-828メチル	4PU	53	84.9	6.1
	2,4-D	BA	66	69.7	3.9
	NAA	カイネチン	56	75.0	4.3
NN	NAA	4PU	31	90.3	11.1
	NK-828メチル	BA	37	100	9.3
	2,4-D	カイネチン	48	77.1	5.9
MT	2,4-D	4PU	36	100	7.4
	NAA	BA	36	86.1	6.6
	NK-828メチル	カイネチン	36	86.1	4.5

1) 植物体を再生した苗条原基1個当たり。

第5表 茎葉増殖に対する要因の数量化Ⅰ類
による解析結果

要 因	水 準	件数	付与係数	範囲	偏相関 係 数
基 本 倍 地	W P	3	-1.800	4.0	0.981
	N N	3	2.200		
	M T	3	-0.400		
オーキシシン	2,4-D	3	-0.833	1.6	0.893
	N A A	3	0.767		
	NK-828メチル	3	0.067		
サイトカイニン	B A	3	0.033	3.3	0.971
	カイネチン	3	-1.667		
	4 P U	3	1.633		
定 数			6.567		
重相関係数=0.9893			寄与率=0.9786		

際、胚軸の上部を挿し木発根させ、形態観察による確認を行っている。しかし、この方法を用いた場合、‘ヒリュウ’や‘カラタチ曲針系’のように苗の形態が屈曲型の系統では判別が容易であるが、‘カラタチ広葉系’や‘カラタチ中葉系’のように直立型の系統では困難である。近年、D N Aフィンガープリントを利用した詳細な変異識別方法が報告⁴⁾されており、今後この方法の利用が必要かと思われる。

今回、誘導したカラタチの苗条原基はカンキツの台木としての大量増殖はもとより、形質転換や細胞融合などの育種、遺伝資源の保存といった目的に広く利用できるものと考えられる。

引 用 文 献

- 1) 原田 久・鈴木啓子・細井寅三(1988)カラタチのカルスからの不定芽分化の制御。園学要旨。昭 63 秋：14-15.
- 2) 廣部 誠(1984)苗木による更新。カンキツの品種更新技術(湯川勇編)，東京：養賢堂，64p.
- 3) 草野成夫・堀江裕一郎・平島敬太(1991)カンキツの優良台木の大量増殖 第1報カラタチ胚軸からの植物体の形成と増殖。園学雑 60 (別1)：655.
- 4) 小松 晃・吉田俊雄・大村三男・秋濱友也(1992) D N Aフィンガープリントによるカラタチ (*Poncitrus*) 属の変異系統の識別。園学雑 61 (別1)：142-143.
- 5) Lloyd, G. and B. McCown (1981) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*kalmialatifolia*) by use of shoot tip culture, Proc. Inc. Proc. Int. Plant Prop. Soc., 30 : 373-375.
- 6) 町田英夫(1987)挿し木のすべて，東京：誠文堂新光社，pp.14-15.
- 7) Murashige, T. and D. P. H. Tucker (1969) Growth Factor Requirements of Citrus Tissue Culture. Proc. Ist Intl. Citrus Symp., 1155-1161.
- 8) Nitsch, J. P. and C. Nitsch (1969) Haploid Plants from Pollen Grains. Science, 163 : 85-87.
- 9) Tanaka, R. and H. Ikeda (1983) Perennial maintenance of annual Haplopappus gracilis (2n=4) by shoot tip cloning. Jpn. J. Genet. 58 : 65-70.
- 10) 谷口研至・田中隆荘(1991)苗条原基の誘導—その理論と方法。バイオホルティ 6 (農耕と園芸編集部編)，東京：誠文堂新光社，pp.9-13.
- 11) 吉田俊雄(1994)カラタチにおける極わい性の遺伝および極わい性個体の G A 3 に対する反応。園学雑 63 : 23-30.