

多胚性カンキツの受精胚カルスからの クローン獲得

池田 稔*・吉田雅夫

神戸大学大学院自然科学研究科

(〒 657 神戸市灘区六甲台町 1-1)

* 現在, 塩野義製薬株式会社 油日ラボラトリーズ

(〒 520-34 滋賀県甲賀郡甲賀町大字五反田 1405)

(1992年10月2日受付)

(1993年1月14日受理)

多胚性カンキツの受精胚組織を起源とする胚化カルス経由の体細胞胚, すなわち雑種クローンの獲得について検討した。カラタチの花粉を交配して78日後の‘マルチーズブラッド’オレンジの胚珠を供試し, マイクロマニピュレータ用ガラスピペットで珠孔近傍から少量の組織片を摘出した, BAとNAAを一定量含むMurashige & Tucker(1969)培地で培養してカルスを誘導し, malt extract $400 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ および adenine $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 添加した同培地に継代すると胚様体が再生された。その後, 実生化をはかったところ, 一部の処理区で三出葉を有する実生が観察された。三出葉を有する実生の獲得率が高かったのは, カルスを誘導する際にBA $5.0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ とNAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, またはBA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ とNAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ を加えた場合であった。優勢形質である三出葉を有する実生は, 受精胚組織が脱分化した後に胚化して再生したものとみられ, 本手法によって雑種クローン増殖の可能性が示唆された。

1. 緒言

カンキツ類において, 栽培品種の多くは多胚性を示すことが広く知られている。この現象は, 受精胚の発生の他に, 多数の珠心胚が無性的に生じることによって起きる¹⁾。一般に, 多胚種子を播種しても通常的手段で交雑実生を獲得することはほぼ不可能である。これは, 多胚形成過程において, 珠心胚が強勢であるために受精胚は弱勢化することによるとされている²⁾。このことは, 交雑育種を阻む大きな要因であり, 従来から新品種の育成を困難にしてきた。

最近, 木本植物において, 植物細胞の持つ分化全能性を刺激して, カルスから不定胚形成を経て植物体再生をはかる系が注目を集めている³⁻⁷⁾。カンキツ類でも, その応用研究がなされつつあり, 花粉^{8,9)}や珠心組織^{10,11)}などからの胚化カルス誘導の系が確立されてきているほか, 成熟胚からのカルス誘導と植物体再生に関する成功例も報じられている¹²⁾。これらの系によれば, 高頻度かつ同

調的に胚発生を誘導できるので, 優良クローンの急速・大量増殖につながる可能性がある。そこで, 本研究においては, これらの研究成果を交雑育種に導入し, 多胚性カンキツを母本とした雑種を効率良く得ることを目的として, 受精胚組織を起源としたカルス経由の体細胞胚誘導, すなわち雑種クローンの獲得と, その増殖について検討した。

2. 材料および方法

推定15年生~20年生の‘マルチーズブラッド’オレンジ5樹を種子親として用いた。開花前日に除雄し被袋を施して, 翌日カラタチの花粉を人工交配した。交配78日後に子房を採取し, 滅菌水に約3分間浸漬後, 1/当たり1滴の展着剤を含む0.8%次亜塩素酸ナトリウム溶液で10分間殺菌処理した。その後, 滅菌水で20分間の浸漬水洗を3回繰り返した。洗浄の後, 無菌条件下で胚珠を摘出した。malt extract $400 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ および adenine $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 添加したMurashige & Tucker

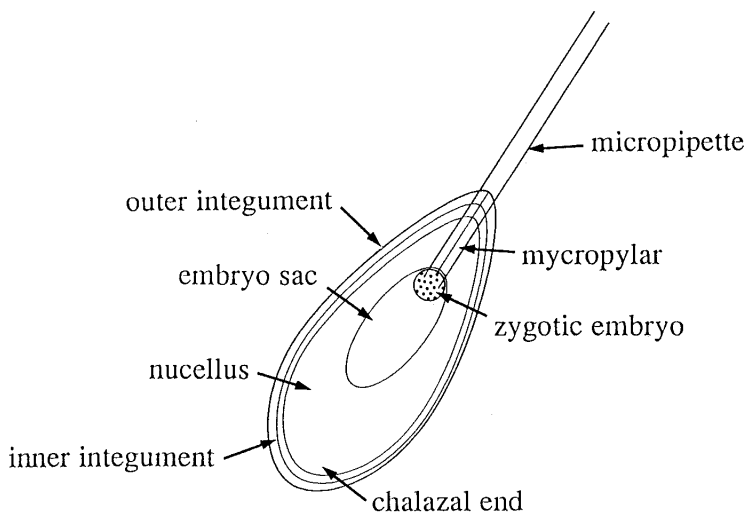


Fig. 1 Inserting a micropipette into the ovule from the micropylar region of embryo sac to excise a piece of zygotic embryo tissue as a source of explant for *in vitro* culture.

(1969)¹³⁾ 培地を pH5.8 に調整し、常法に従って 121°C で 15 分間高圧滅菌したものに胚珠を置床して、25±1°C、約 2000 lux (14 時間日長)の明条件下で予備的に培養した。培養 3 日後に、マイクロマニピュレータ用ガラスピペット(先端口径=約 0.7 mm)を培養胚珠の珠孔先端付近から中ほどまで挿入して組織片を摘出した(**Fig. 1**)。組織片は、6-benzylaminopurine (BA) および alpha-Naphthaleneacetic acid (NAA) を一定量添加し、Gelrite 2.0 g·l⁻¹ を含む同 Murashige & Tucker 培地に置床した。その際、1 個の胚珠から 1 組織片を摘出し 1 処理区に付き 20 組織片を供試して、25±1°C の

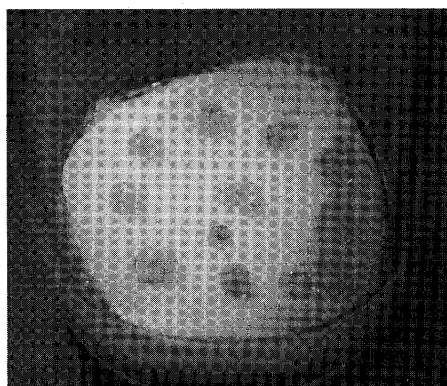


Fig. 2 Callus induced from the excised tissue cultured on Murashige and Tucker (1969) basal medium supplemented with BA and NAA.

暗条件下で培養した。なお、20 日毎に同一培地に継代したが、培養開始 40 日後までは 50 ml の管びん 1 個当たり組織片 10 個ずつを置床し、その後は管びん 1 個当たり組織片 1 個ずつを培養した。培養 60 日後には、カルスを生じた組織片の数を調査するとともに、BA と NAA を全く含まず malt extract 400 mg·l⁻¹ および adenine 10 mg·l⁻¹ を添加して Gelrite を除いた同 Murashige & Tucker 培地を多孔質性の耐熱樹脂マットに浸潤させ管びんの下層に敷いて、発生したカルスを継代した。また、培養 95 日後には胚様体の形成を観察しながら、カルス経由で胚様体を生じた組織片の数を調べた。さらに、培養 100 日後からは Gibberellic Acid 3 (GA₃) 1.0 mg·l⁻¹ および Gelrite 2.0 g·l⁻¹ を含む同 Murashige & Tucker 培地に継代して実生化をはかった。なお、培養 60 日以後は 25±1°C、約 2000 lux (14 時間日長)明条件下に移して培養した。培養 148 日後、カルスから不定胚を経て生じた実生について三出葉の有無を調査した。

3. 結 果

培養 30 日後頃から、BA のみ、あるいは BA および NAA を一定量添加した区でカルスが発生した (**Fig. 2**)。50 日~60 日後にはそれらのカルス発生がさらに顕著に認められるようになった。発生したカルスは一部褐色のものもあったが、そのほとんどが白色あるいは淡いクリーム色で小粒状であった (**Fig. 3**)。

ホルモンフリー区からも若干量のカルスを生じたが、それらは薄い白色か、もしくは無色の水浸状であり、胚形成能を有しないカルスであるとみられた。

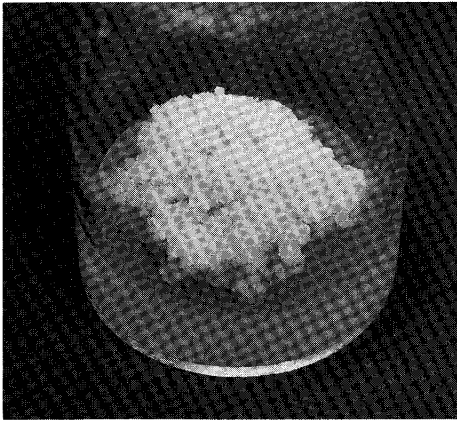


Fig. 3 Yellowish-white and friable embryogenic callus induced from the excised tissue cultured on the medium *in vitro*.

比較的多くのカルスが発生したのは、BA $1.0\sim 5.0$ $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 添加区、または BA $0.1\sim 1.0$ $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ および NAA 0.1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 添加区であった。これらの処理区では、80日～85日後にはカルスから直径 $1.5\text{mm}\sim 2.0$ mm 程度の球状組織が顕れて部分的に緑色を呈した。95日後にはカルス中の緑色球状組織から胚様体が観察されるようになった (**Fig. 4**)。110日以降は、発芽的生長が旺盛となった (**Fig. 5**)。

148日後に得られた実生の本葉を調査したところ、一部の処理区で三出葉を認めた (**Fig. 6**)。三出葉を有する実生が観察されたのは、BA 0.1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 添加区、BA 5.0 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 添加区、BA 1.0 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ および NAA 0.1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 添加区、BA 5.0 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ および NAA 0.1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$

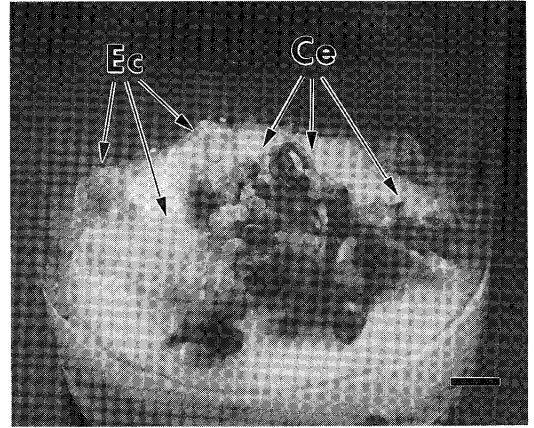


Fig. 5 The embryoids developed into cotyledonary embryos, and germinated with viability.

(Ce: cotyledonary embryo, Ec: embryonic cluster) [Scale bar shows 3.0 mm]

l^{-1} 添加区であった。特に BA 5.0 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ および NAA 0.1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 添加区では、再生された6個体中5個体が三出葉を有していた (**Table 1**)。

4. 考 察

受精後一定期間を経た胚珠から少量の組織片を摘出して一定条件下で培養すると、カルスを経由して体細胞胚を再生させることが可能であった。本手法によって摘出された組織は、受精胚の他に、珠孔近傍の珠心胚、もしくは珠孔周囲の珠心組織などを同時に含むものと考えられる。従って、優勢形質である三出葉を有する実生は、受精胚の組織が脱分化した後に胚化して再生したものと考えられ、一方の母本と同じ単出葉を有する実生は、珠心

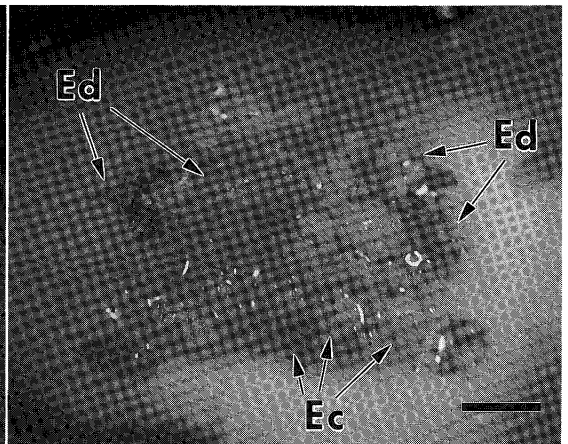
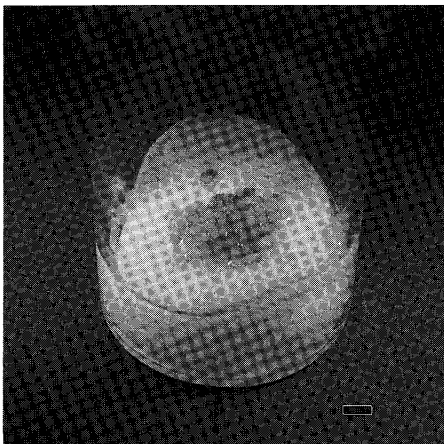


Fig. 4 Many somatic embryoids emerging from the callus.

(Ec: embryonic cluster, Ed: embryoid) [Scale bar shows 3.0 mm]

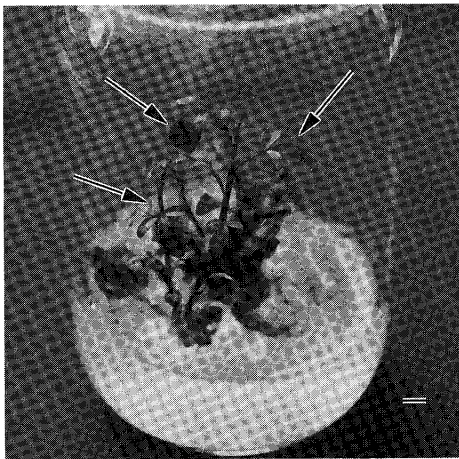


Fig. 6 F₁ hybrid seedlings having trifoliate leaves proliferated. Arrow head indicates trifoliate leaves. [Scale bar shows 3.0 mm]

胚の一部組織が脱分化した後に胚化したか、胚化始原細胞を有する珠心組織が未分化のまま増殖した後に胚化したものと推測された。BA の他に少量の NAA を添加し

た場合に三出葉を有する実生の獲得率が高まっていることからすれば、NAA の添加は選択的に珠心胚組織の脱分化を阻害したか、あるいは受精胚組織の脱分化を誘導したものと思われた。本手法では、主に受精胚組織を摘出していることや、一般に NAA が植物組織の脱分化を誘うことを考慮すると、NAA は受精胚組織を脱分化させた可能性が強い。

本実験では交配 78 日後に胚珠を摘出した。一般に多胚性カンキツでは、受精卵細胞の分裂開始前、あるいは同時期に珠心胚始原細胞が発生を開始することが明らかにされている¹⁴⁾。やがて、それぞれは受精胚あるいは珠心胚へと生長するが、発生が進むにつれて両者に養水分摂取の競合が激しくなり、往々にして受精胚は生長競争に破れ、珠心胚が旺盛な発育を遂げる¹⁵⁾。本実験の目的からすれば、受精胚は発育段階にあって弱勢化する以前に組織片を摘出することが有効であると考えられた。予備的に行った組織学的観察によれば、交配 78 日後の受精胚は、直径 250~300 μm 程度の心臓型胚期であり、ほぼ珠孔近傍に位置しており、同一胚珠内における珠心胚との養分競合もそれほど進んでいなかったために、この時期を培養の適期と判断した。

Table 1. Effect of hormonal supplements to basal culture medium on callus induction, embryoid development, and F₁ hybrid (Maltese Blood orange × trifoliate orange) clone production.

Supplement* ¹ concentration (mg·l ⁻¹)		No. of explants* ²			No. of proliferated plants* ⁵		
BA	NAA	primary cultured	callus* ³ induced	embryoid* ⁴ developed	total	having monofoliate* ⁶ leaves(%)	having trifoliate* ⁷ leaves(%)
0	0	20	1	0	0	0(0.0)	0(0.0)
0.1	0	20	4	3	7	6(85.7)	1(14.3)
1.0	0	20	9	6	16	16(100.0)	0(0.0)
5.0	0	20	11	8	23	22(95.7)	1(4.3)
0.1	0.1	20	8	2	3	3(100.0)	0(0.0)
1.0	0.1	20	7	4	14	12(85.7)	2(14.3)
5.0	0.1	20	6	3	11	6(54.5)	5(45.5)

*¹Various concentrations of BA and NAA were supplemented to Murashige and Tucker basal medium in the primary culture.

*²Immature ovules of 'Maltese Blood' orange were pre-cultured for 3days, and then a piece of zygote tissue was excised from each ovule as culture explant by using a micropipette for *in vitro* culture.

*³Callus was induced from the explant at about 30days after inoculation (30DAI), and multiplied at about 60DAI.

Some were yellowish-white friable callus, the others were white-washy ones. No. of explants which formed callus was counted at 60DAI.

*⁴Some embryoids were developed from the yellowish-white friable callus. No. of explants which developed embryoid via callus formation was counted at 95DAI.

*⁵Some plants proliferated from the explants via callus formation. No. of proliferated plants was counted at 148DAI.

*⁶Proliferated plants having monofoliate leaves showed to be nucellar one.

*⁷Proliferated plant having trifoliate leaves showed to be zygotic one.

また、3日間予備培養した後に組織を摘出したのは、実験操作上の理由による。すなわち、子房から適出した胚珠は乾燥が著しく、すぐ置床しないと枯死してしまうことや、胚珠の摘出と組織片の摘出作業を分離した方が効率的であったためである。なお、培養60日~100日にかけては多孔質性の樹脂マットを支持体としてカルスを培養した。このようなマットを使用した場合には、培地液相と空気相が適度に混じり合って、より正常な胚的生長が誘導されるものと考えられたためである¹⁶⁾。

本実験では、マイクロマニピュレータ用ガラスピペットを活用して、簡易の手法で組織を摘出した。ただし、受精胚組織を起源とする体細胞胚をより多く獲得するためには、摘出する組織片の調整が重要と思われる。そこで、本来のマイクロマニピュレータ装置を使用して組織の摘出部位を受精胚に限局する工夫を凝らしたり¹⁷⁾、摘出した組織片を保護培養 (nurse culture) したり、あるいは発生したカルスを懸濁培養するなど改良の余地が多く残されている。今後、これらの点で改良を加えれば、雑種クローンの大量増殖につながり、多胚性カンキツの育種能率を向上させるものと思われた。また、本手法は、雑種を獲得することがきわめて難しい異種・異属間の遠縁交雑において、早期退化する受精胚組織を救出 (embryo rescue) する方法としても活用できるものと考えられた。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、実験材料調達に格別のご高配を賜った和歌山県果樹園芸試験場長 山下重良氏、同試験場主査研究員 宮本久美氏、ならびに和歌山県有田

農業改良普及所普及員 (現、和歌山県果樹園芸試験場研究員) 鯨 幸和氏に深謝致します。

文 献

- 1) Yang, H. J., 1968. *J. Japan. Soc. Hort.*, **37**: 8-15.
- 2) Esen, A., R. K. Soost, 1977. *Amer. J. Bot.*, **64** (6): 607-614.
- 3) Stamp, J. A., C. P. Meredith, 1988. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **113** (6): 941-945.
- 4) Bhansali, R. R., J. A. Driver, D. J. Durzan, 1990. *Plant Cell Rep.*, **9**: 280-284.
- 5) Vieitez, F. J., M. C. San-Jose, A. Ballester, A. M. Vieitez, 1990. *J. Plant Physiol.*, **136**: 253-256.
- 6) Yadav, U., M. Lai, V. S. Jaiswal, 1990. *Plant Cell Tissue and Organ Cult.*, **21**: 87-92.
- 7) Vega de Rojas, R., S. L. Kitto, 1991. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **116** (4): 747-752.
- 8) Hidaka, T., 1984. *J. Japan Soc. Hort. Sci.*, **53**: 1-5.
- 9) Hidaka, T., M. Omura, 1989. *Japan. J. Breed.*, **39**: 169-178.
- 10) Gmitter, F. G., G. A. Moore, 1986. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, **6**: 139-147.
- 11) Vardi, A., E. Galun, 1988. *Scientia Hort.*, **37**: 217-230.
- 12) Hidaka, T., I. Kajiura, 1988. *Scientia Hort.*, **34**: 85-92.
- 13) Murashige, T., D. P. H. Tucker, 1969. *Proc. 1st Int. Citrus Symp.*, Vol. 3, Riverside, California: 1155-1161.
- 14) Wakana, A., S. Uemoto, 1987. *Amer. J. Bot.*, **74** (4): 517-530.
- 15) Wakana, A., S. Uemoto, 1988. *Amer. J. Bot.*, **75** (7): 1033-1049.
- 16) Ikeda, M., T. Nakanishi, M. Yoshida, 1991. *International Symp. on Angiosperm Pollen and Ovules*. Villa Olmo, Como Italy: 26.
- 17) Gilmour, D. M., M. R. Davey, E. C. Cooking, 1987. *Plant Science*, **53**: 263-270.

Summary

In vitro Clonal Propagation of F₁ Hybrids via Callus Formation from Zygotic Embryos in Polyembryonic *Citrus*

Minoru IKEDA* and Masao YOSHIDA

*Division of Science of Biological Resources, The Graduate School of Science and Technology,
Kobe University, 1-1 Rokkodai-chou, Nada, Kobe, 657 Japan*

* Current address: *Shionogi & Co., Ltd., Aburahi Laboratories,
1405 Gotanda, Koka-chou, Koka-gun, Shiga, 520-34 Japan*

The possibility of clonal propagation from zygotic embryo callus was investigated. Ovules of polyembryonic 'Maltese Blood' orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] previously hand-pollinated with trifoliolate orange [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] were picked out aseptically from young fruit at 78 days after pollination. Inserting a micropipette into the ovule from the micropylar region of the embryo sac, a piece of zygote tissue was excised as a source of explant. The explant was cultured on Murashige and Tucker (1969) basal medium supplemented with various concentrations and combinations of 6-benzylaminopurine (BA) and α -naphthaleneacetic acid (NAA). Regenerative callus was subsequently induced. The callus was transferred onto a medium containing 400 mg \cdot liter⁻¹ malt extract and 10 mg \cdot liter⁻¹ adenine. Adventitious embryoids readily arose. The embryoids eventually grew into mature embryos which successfully resulted in entire plantlets after transplantation onto a medium containing 1 mg \cdot liter⁻¹ gibberellic acid (GA₃). The ovule was cultured on a medium containing 5.0 mg \cdot liter⁻¹ BA and 0.1 mg \cdot liter⁻¹ NAA to induce the callus, and many plantlets with trifoliolate leaves appeared. Those plantlets were, consequently, considered to be F₁ hybrid clones.