

## 高温条件下での胚珠培養による 多胚性カンキツの雑種獲得

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)

(1993年2月4日受付)

(1993年7月24日受理)

胚発生の初期段階にあるカンキツの幼胚珠を温度環境を変えて培養し、交雑胚の獲得率について検討した。カラタチの花粉を交配した‘マルチーズブラッド’オレンジと‘ダンカン’グレープフルーツの幼胚珠を malt extract 400 mg·l<sup>-1</sup> および adenine 10 mg·l<sup>-1</sup> を添加した Murashige & Tucker (1969) 培地に置床した。温度条件を変えて 70 日間培養したところ、生存胚珠数は 25°C 区および 30°C 区で多く、20°C 区ではかなり減少する傾向であった。これらの胚珠を、malt extract の濃度を次第に下げ adenine の代わりに GA<sub>3</sub> 10 mg·l<sup>-1</sup> を添加した同培地で継代培養した。培養 135 日後に三出葉を有した雑種実生の獲得率を調査した結果、‘マルチーズブラッド’オレンジの場合に 30°C 区で 13.5%，‘ダンカン’グレープフルーツの場合に 30°C 区で 10.8%，25°C 区で 1.1% であり、*in vitro* において高温条件を与えるながら幼胚珠を培養すると雑種実生を効率的に獲得できることが明らかとなった。

### 1. 緒 言

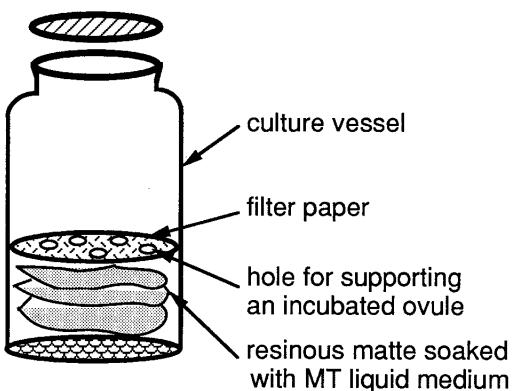
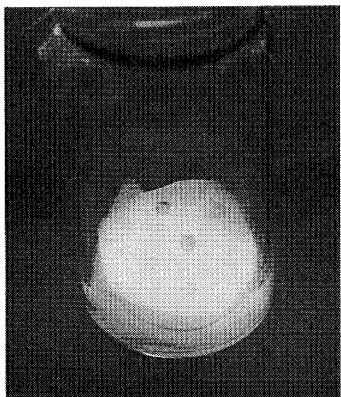
カンキツ類には多数の種類や系統が知られているが、現在栽培されている品種には多胚性 (polyembryony) を示すものが多い。この現象は、1 個の受精胚 (fertilized embryo または zygotic embryo) の他に、同一胚囊内で多数の珠心胚 (nucellar embryo または adventive embryo) を生じるものである<sup>1,2)</sup>。すなわち、通常の有性生殖の他に、珠心組織の細胞が始原となって無性的に胚発生を遂げるものであり、無融合生殖 (apomixis) の範疇に属する<sup>3,4)</sup>。

このような多胚種子を播種しても、多くの場合に交雑実生を得ることはきわめて難しい。それは、胚発生過程において珠心胚の発育が旺盛なために、受精胚は生長競争に敗け弱勢化することが原因であるとされている<sup>5)</sup>。このことは、交雑育種を行う上で大きな障害となっており、従来からカンキツ類の新品種育成を阻んできた。

これまでの研究から、多胚性の程度は果実の着生位置によって左右され、特に南側の果実において 1 種中に生ずる胚の数が少ないと観察されている<sup>6)</sup>。中谷ら (1878, 1982, 1984) は多胚形成期に母木をガラス室や温室で栽培して温度環境を変えると 1 種子中の珠心胚の数が減る傾向を示し交雫実生を獲得する可能性が高まるなどを報じている<sup>7-9)</sup>。これらの内容は、従来から困難とされている多胚性カンキツの交雫育種を進める方法として評価できる。ただし、温度条件によって多胚性の制御を試みたこれまでの実験は全て施設栽培を含めた圃場レベルで実施されており、効率よく実験を行うためにはさらに研究の余地があるものと考えられる。また、多胚形成の発現機構を解明するという観点からも、簡便な方法で胚発生を制御する条件を検討しておくことは必要であると思われる。

そこで、本研究では多胚性カンキツの幼胚珠を培養し温度条件が胚発生に与える影響を確認するとともに、*in vitro* 条件下で高温条件を与えて、雑種実生を効率的に獲得する可能性について検討した。

\*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)



**Fig. 1** Immature ovules were cultured on the resinous matto soaked with Murashige and Tucker (1969) liquid medium.

## 2. 材料および方法

推定15~20年生の‘マルチーズブラッド’オレンジおよび‘ダンカン’グレープフルーツ各5樹を種子親として用いた。いずれも開花前日に除雄し被袋したものに、翌日カラタチの花粉を交配した。交配30日後に子房を採取して、滅菌水に約3分間浸漬後、1l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。洗净後、眼科手術用ナイフおよび実体顕微鏡を用いて無菌条件下で子房を切開し、珠柄部分を切除して摘出した幼胚珠を供試した。培養には、malt extract  $400 \text{ mg} \cdot l^{-1}$  および adenine  $10 \text{ mg} \cdot l^{-1}$  を添加した Murashige & Tucker (1969)<sup>10)</sup> 培地（以下、MT 培地）を pH 5.8 に調整し、常法に従って 121°C で 15 分間高圧滅菌して用いた。培養支持体としては多孔質性の耐熱樹脂マットを使用し、液体培地 10 ml を湿润させ容量 50 ml の管瓶の下層に敷いて幼胚珠を置床した (Fig. 1)<sup>11)</sup>。培養開始直後から幼胚珠を3基の小型チャンバー内に入れ、各々  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  に

温度設定して、約 2000 lux (14 時間日長) の明条件下で静置培養した。培養 70 日後に生存胚珠の数および大きさを調査した。その後は全ての胚珠を  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  条件下に移して培養を続け、培養 135 日後に植物体の数を調べるとともに三出葉の有無を観察した。各実験区には約 50~150 胚珠を培養して 25 日毎に同一組成の MT 培地で継代を繰り返した。培養 25 日後の継代時にはピンセットで外種皮を剥離した。また、培養 75 日後の継代時からは、adenine を含まず malt extract の含有濃度を  $300 \text{ mg} \cdot l^{-1}$  に改変して、支持体として樹脂マットの代わりに  $2.0 \text{ g} \cdot l^{-1}$  のゲルライトを含む同 MT 培地で培養し生長を促した。さらに、培養 100 日後の継代時からは malt extract の含有濃度を  $100 \text{ mg} \cdot l^{-1}$  に改変し gibberellic acid ( $\text{GA}_3$ ) を  $1.0 \text{ mg} \cdot l^{-1}$  添加した同 MT 培地で培養して実生化をはかった。

## 3. 結 果

### (1) 温度条件の違いが胚珠発達に及ぼす影響

培養の温度条件の違いは胚珠の発達に著しい影響を及ぼした。培養 40 日後頃よりその差が観察されるように



**Fig. 2** The growth of cultured ovules was significantly affected by the cultural temperature. The development of ovules was favorable at  $25^\circ\text{C}$  (middle) and  $30^\circ\text{C}$  (right), but was seriously inhibited at  $20^\circ\text{C}$  (left) in the case of ‘Maltese Blood’ orange.  
[Scale bar = 3.0 mm]

**Table 1.** Effect of cultural temperature on *in vitro* *Citrus* ovule development.

Cultivar	Cultural temperature (°C)	No. of cultured ovules* <sup>1</sup>	No. of viable ovules* <sup>2</sup> (%)	Diameter of polyembryonic mass* <sup>3</sup> (mm)
'Maltese Blood' orange	20	150	29 (19.3)	2.3±0.3* <sup>4</sup>
	25	150	107 (71.3)	6.8±0.3
	30	148	63 (42.6)	3.3±0.3
'Duncan' grapefruit	20	50	9 (18.0)	0.9±0.2
	25	49	24 (48.9)	3.5±0.4
	30	49	25 (51.0)	3.6±0.4

\*<sup>1</sup> Ovules were collected aseptically at 30 days after pollination and initially cultured on Murashige and Tucker (1969) medium.

\*<sup>2</sup> Viable ovules were estimated at 70 days after inoculation.

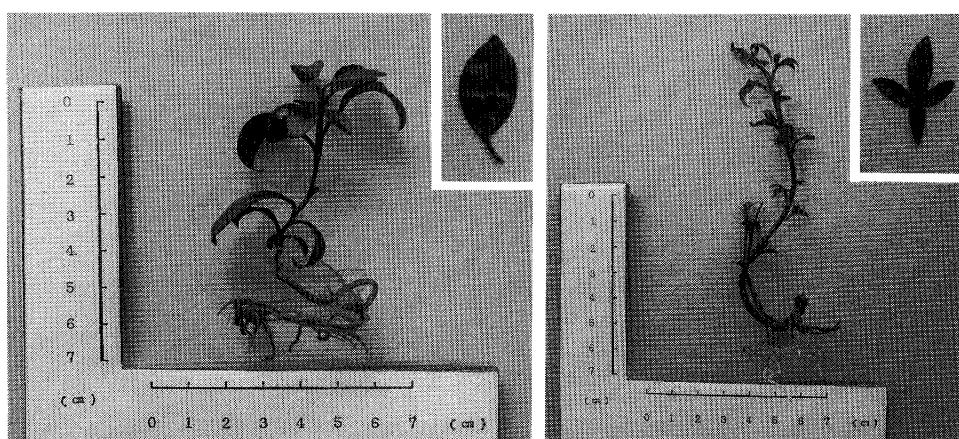
\*<sup>3</sup> Polyembryonic mass was originated from the ovule.

\*<sup>4</sup> Mean±S. E.



**Fig. 3** Some embryos developed from the cultured ovule at 25°C (middle) and 30°C (right), while few embryos developed at 20°C (left) in the case of 'Maltese Blood' orange.

[Scale bar=3.0 mm]



**Fig. 4** Seedlings differentiated from the cultured ovules in the case of 'Maltese Blood' orange.

Some of them had trifoliate leaves (right), and the others had monofoliate ones (left). Those seedlings with trifoliate leaves were considered to be hybrids.

(Upper right corner shows the leaf in each.)

**Table 2.** Effect of cultural temperature on *in vitro* hybrid ('Maltese Blood' orange×trifoliate orange) production.

Cultural temperature (°C)	Total	No. of seedlings* <sup>1</sup>	
		Having monofoliate leaves (%)	Having trifoliate leaves (%)
20	11	11 (100.0)	0 ( 0.0)
25	564	564 (100.0)	0 ( 0.0)
30	177	153 ( 86.5)	24 (13.5)

\*<sup>1</sup> About 150 ovules were initially cultured on Murashige and Tucker (1969) medium in each cultural temperature, and subcultured every 25 days. After 70 days in culture, 29, 107 and 63 ovules were viable at 20°C, 25°C and 30°C respectively (Datas were shown in **Table 1**). At 135 days after inoculation, seedlings were counted and assessed by investigation of the leaf morphology.

\*<sup>2</sup> Seedling having monofoliate leaves shows to be nucellar.

\*<sup>3</sup> Seedling having trifoliate leaves shows to be zygotic.

**Table 3.** Effect of cultural temperature on *in vitro* hybrid ('Duncan' grapefruit×trifoliate orange) production.

Cultural temperature (°C)	Total	No. of seedlings* <sup>1</sup>	
		Having monofoliate leaves (%)	Having trifoliate leaves (%)
20	3	3 (100.0)	0 ( 0.0)
25	190	188 ( 98.9)	2 ( 1.1)
30	139	124 ( 89.2)	15 (10.8)

\*<sup>1</sup> About 50 ovules were initially cultured on Murashige and Tucker (1969) medium in each cultural temperature, and subcultured every 25 days. After 70 days in culture, 9, 24, and 25 ovules were viable at 20°C, 25°C and 30°C respectively (Datas were shown in **Table 1**). At 135 days after inoculation, seedlings were counted and assessed by investigation of the leaf morphology.

\*<sup>2</sup> Seedling having monofoliate leaves shows to be nucellar.

\*<sup>3</sup> Seedling having trifoliate leaves shows to be zygotic.

なり、特に 20°C 条件下の胚珠は他の条件下のものに比べて発育程度が劣っていた (**Fig. 2** および **Table 1**)。また、幼胚珠から発達した複数の胚を含む組織塊の大きさについても同様の傾向が観察された (**Fig. 3**)。これらの結果から、25°C および 30°C の環境温度は胚珠の発達にとって好適であり、一方の 20°C 条件は胚珠培養に不適であることが明らかとなった。なお、20°C 条件下では水浸状を呈する白色のカルスが発生したもの、胚化することはなかった。

## (2) 雜種実生の獲得

培養 135 日後の調査では、温度条件によって三出葉を有するオレンジとカラタチの雑種と見られる実生が確認された (**Fig. 4**)。雑種の獲得率は、「マルチーズブラッド」オレンジの場合に 30°C で 13.5%、「ダンカン」グレープフルーツの場合には 30°C で 10.8%、25°C で

1.1% であった。いずれの品種においても、その他の処理区では雑種が全く出現しなかった (**Table 2** および **3**)。また、20°C 条件下では、培養した胚珠の大半は生育状態が悪くからうじて生長を維持しているものと見られ、ほとんど実生は得られなかった。

## 4. 考 察

オレンジの幼胚珠培養において、温度条件が胚珠の発達に著しい影響を及ぼすことが判明した。さらに、高温条件下では胚珠から優性形質であるカラタチ花粉由来の三出葉を有する実生が出現し、雑種を効率的に獲得する効果が認められた。すなわち、30°C 条件下では得られた実生数がかなり減少したものの、雑種実生が 10 ~13% 程度出現した。このような現象が生じた機構は明らかではない。しかし、一般的に、温度環境の変化は多くの植物に様々な刺激を及ぼす<sup>12~15</sup>ことから、本実

験における30°Cの環境条件がある種のストレスとなつて特に珠心胚の発生を選択的に抑制したものと思われた。同一胚珠内において珠心胚の発生が抑制されれば養水分攝取の競合関係が緩和されるために、結果的に受精胚の生長が促されるものと推測される。元来、カンキツ類は亜熱帯果樹または南部温帯果樹であり、高温要求性のものが多い。自然条件下で他殖による多様な進化を遂げてきたことを考慮すると、多胚性カンキツにとって高温条件は有性繁殖の一つの条件であったことも考えられる。

両品種の雑種実生の獲得率に若干の差異があったことについては、*in vivo* 条件で栽培した場合の完熟種子に含まれる胚数の違いを挙げることができる。品種により異なるとされている平均胚数は、「マルチーズブレッド」オレンジが9.64個、「ダンカン」グレープフルーツが14.94個である<sup>16)</sup>。このことが「ダンカン」グレープフルーツから雑種実生の出現がやや少なかったことの原因であろうと考えられる。

なお、本実験では交配30日後の幼胚珠を培養に供試した。これは、予備的に行なった組織学的実験から、両品種とともに受精期は交配10日～12日後、受精卵細胞の分裂開始期が交配35日～40日後であり、それに前後して珠心胚の始原細胞が分裂を開始したことによるものである。つまり、交配10～12日後までに胚珠を培養するのでは受精胚は得られず珠心組織を起源とする珠心胚だけが生長する。また、珠心胚の始原細胞が分裂を開始すると、受精胚との養分競合が生じて結果的に珠心胚が旺盛な発育を遂げることになる<sup>17)</sup>。そこで、両者の競合が進まない内に珠心胚の発生だけを選択的に抑え受精胚を獲得することを意図して、この時期に培養を開始した。

また、温度を変えて培養する期間は70日間とした。これは、多胚形成期すなわち胚の生長過程において温度環境を変化させることができ、胚発生を制御することに有效ではないかと判断したことによる。実際、培養60日以降になると発芽の生長がかなり進むようになったため、培養70日後には全て25°C条件下に移した。

以上のように、*in vitro* 条件下において高温条件を与えるながら幼胚珠を培養して雑種実生を効率的に獲得できることが明らかとなった。*in vitro* の系を用いれば、一度に多数の胚珠を培養することが可能である。さらに、温度環境の制御も容易であり、より斉一な環境のもとで雑種実生の生長を促すことができる。このことは、育種に要する時間と経費の節約にもつながるうえ、より至適な温度区を設定することで雑種の獲得率がさらに高まる

可能性もあることから、従来より困難とされてきた多胚性カンキツの交雑育種を進展させる有力な方法として期待できる。

今後は、花粉親にオレンジ類などの実用形質を兼ね備えた品種を用いて交配を行うなど、実際の育種に活用するための検討を行なう必要があ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わ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。また、資料を提供していただいた農林水産省農業生物資源研究所放射線育種場研究員 吉岡藤治氏に感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Yang, H. J., 1968. J. Japan. Soc. Hort. Sci., **37**: 102-110.
- 2) Esen, A., R. K. Soost, 1977. Amer. J. Bot., **64** (6): 607-614.
- 3) Wakana, A., S. Uemoto, 1988. Amer. J. Bot., **75** (7): 1033-1049.
- 4) 小林省蔵、池田 勇、中谷宗一, 1978. 果樹試報 Ser. E, **2**: 9-24.
- 5) Furusato, K., Y. Ohta, K. Ishibashi, 1957. Seiken Zihō, **8**: 40-48.
- 6) 上野 勇、西浦昌男, 1969. 園試報 Ser. B, **9**: 11-19.
- 7) 中谷宗一、池田 勇、小林省蔵, 1978. 果樹試報 Ser. E, **2**: 25-38.
- 8) 中谷宗一、池田 勇、小林省蔵, 1982. 果樹試報 Ser. E, **4**: 29-39.
- 9) Susanto, S., Y. Nakajima, K. Hasegawa, 1991. Environ. Control in Biol. **29** (3): 29-105.
- 10) Murashige, T., D. P. H. Tucker, 1969. Proc. 1st Int. Citrus Symp., Vol. 3, Riverside, California: 1155-1161.
- 11) Ikeda, M., T. Nakanishi, M. Yoshida, 1991. International Symp. on Angiosperm Pollen and Ovules. Villa Olmo, Como, Italy: 26.
- 12) Egea, J., L. Burgos, N. Zoroa, L. Egea, 1992. J. Hort. Sci., **67** (2): 247-250.
- 13) Khah, E. M., H. C. Passam, 1992. J. Hort. Sci., **67** (2): 251-258.
- 14) Dreesen, D. R., R. W. Langhans, 1992. J. Amer. Hort. Sci., **117** (2): 209-215.
- 15) 中谷宗一、池田 勇、小林省蔵, 1984. 果樹試報 Ser. E, **5**: 29-34.
- 16) 中谷宗一、池田 勇、小林省蔵, 1980. 果樹試報 Ser. E, **3**: 15-23.
- 17) 小林省蔵、池田 勇、中谷宗一, 1982. 果樹試報 Ser. E, **4**: 21-27.

## Summary

# Hybrids Obtained through Artificial Regulation of *Citrus* Polyembryogenesis by *In Vitro* Ovule Culture under the Condition of High Ambient Temperature

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 effect of cultural temperatures on *Citrus* polyembryogenesis through *in vitro* ovule culture was studied. Ovules of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] previously hand-pollinated with trifoliolate orange [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] were collected aseptically at 30 days after pollination, and cultured on Murashige and Tucker (1969) basal medium supplemented with 10 mg•liter<sup>-1</sup> adenine and 400 mg•liter<sup>-1</sup> malt extract. The ovules were subcultured every 25 days. The growth of ovules was significantly affected by the cultural temperature. The development of ovules was favorable at 25°C and 30°C, but was seriously inhibited at 20°C. Many embryos were subsequently differentiated from the ovules at 25°C and 30°C. When the embryos were transplanted to the basal medium containing 1 mg•liter<sup>-1</sup> gibberellic acid (GA<sub>3</sub>), they eventually grew into seedlings. Some of them had trifoliolate leaves, and the others had monofoliolate ones. After 135 days in culture, seedlings with the trifoliolate leaves appeared in high frequency at 30°C. Those seedlings were considered to be hybrids. It was, consequently, suggested that *Citrus* hybrids could be obtained efficiently by *in vitro* ovule culture under the condition of high ambient temperature.