

---

カンキツ類における倍数性周縁キメラ植物体の  
発生起源の解明と育種的利用に関する研究

---

17580031

平成17年度～平成19年度科学研究費補助金  
(基盤研究(C)) 研究成果報告書

平成20年3月

研究代表者 國 武 久 登

宮崎大学農学部教授

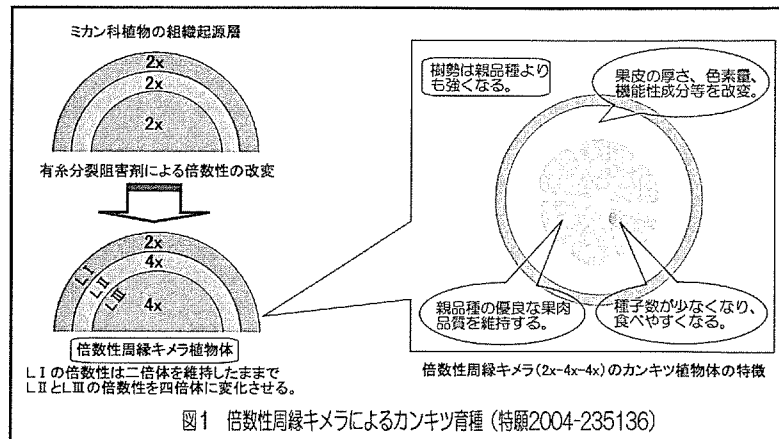
## はしがき

本報告書は、平成 17 (2005) 年度から 19(2007)年度までの 3 年間にわたる文部科学省科学研究費基盤研究 (C) による研究成果の概要をとりまとめたものである。

カンキツ類とは、植物分類学上ミカン科 (*Rutaceae*), ミカン亜科 (*Aurantioideae*) に属するカンキツ属 (*Citrus*), キンカン属 (*Fortunella*) およびカラタチ属 (*Poncirus*) の 3 属を指し、世界の重要な果樹の一つとして亜熱帯から温帯に至る広い地域で栽培されている。カンキツ類の生産は現在でも増加傾向にあり、カンキツ生産量は、約 1 億トンと報告されており、果樹の中で世界一の生産量である (FAO, 2006)。現在、カンキツ類で主に栽培、生産されているのは、スイートオレンジ (*C. sinensis* Osbeck), マンダリン (*C. reticulata* Blanco), グレープフルーツ (*C. paradisi* Macf.), レモン (*C. limon* Burm. f.) およびライム (*C. aurantifolia* Swingle) などである。これらには数多くの品種が存在するが、それらのほとんどが生食または加工用として利用しやすい無核あるいは少核の特徴を有する。また、無核性以外に、高糖度、耐寒性、耐乾性、剥皮性、耐病性、早晩性および貯蔵性なども育種目標として掲げられており、さらに、最近では食生活の多様化と健康指向の高まりにより、美味しい果実であるとともに、その機能性食品としての二次代謝成分に対する関心が高まっており、健康機能性に着目した成分育種も行われている (Kato ら, 2004; Kawai ら, 2001; Ogawa ら, 2000; 山本ら, 1998)。カンキツ類における主な育種方法には、ウンシュウミカン (*C. unshiu* Marc.) に代表される「枝変り」などを利用した突然変異育種法や「清見」, 「津之香」 および 「不知火」などを育成した交雑育種法があげられる (岩崎ら, 1966; 松本ら, 1991; 西浦ら, 1972; 1983)。これらの育種法が現在栽培されているほとんどのカンキツ品種を育成したといっても過言ではない。この他、特徴的な育種法として小林ミカンや金柑子温州などで知られる接ぎ木キメラを利用した育種法や細胞融合、遺伝子組換えなどのバイオテクノロジーによる育種法などがある (Kobayashi ら, 1988; 1991; 1995; Ohgawara ら, 1985; 1989; Sugawara ら, 2002; Takami ら, 2004; 2005)。さらに、無核系統を効率的に育成する手法である三倍体育種に代表される倍数性育種があげられる (Recupero ら, 2005; Soost・Cameron, 1980; 1985; 徳永ら, 2005; 吉田ら, 2003)。しかしながら、カンキツ類の育種を進める上での障害として、多胚性 (上野ら, 1967; 奥代ら, 1981), 雌雄性不稔性 (Iwamasa, 1966; Nakano ら, 2001; 山本ら, 1992a; 1992b; Yamamoto ら, 1997; Yamamoto・Tominaga, 2002) および自家不和合性 (Yamashita, 1978; 山下, 1980) などがあり、さらに、果樹などの永年作物は、雑種性が強く、播種から開花結実に至るまで長年月を要するため、有用形質に関する遺伝情報が乏しく、計画的な育種の推進が困難である。

さて、カンキツ類の茎頂分裂組織は 3 つの組織起源層からなり、外側から第 1 層 (L I)、第 2 層 (L II)、第 3 層 (L III) と呼ばれ、第 1 層から主な可食部となる果肉組織、第 2 層から果皮や生殖組織及び第 3 層から葉脈等が発生するとされている。現在までのカンキツの育種は、前述した交雑育種や突然変異育種が中心であり、組織起源層ごとの育種は試みられていない。近年、Kuhara ら (1988) は寄せ接ぎ法を改良して、合成周縁キメラ植物体を育成し、その病害抵抗性の育種的意義について報告した。また、Sugawara ら (2002) は温州ミカンとオレンジの合成周縁キメラを育成し、剥皮性の優れたオレンジの育成に成功した。さらに國武 (2004) は、ニンボウキンカンの珠心胚へのコルヒチン処理により、組織起源層 L I、L II 及び L III の倍数性を  $2x \cdot 4x \cdot 4x$  に操作し、倍数性周縁キメラ植物体を育成した (特

願 2004-235136)。これによりニンポウキンカンのL1は、二倍体のままで良食味を維持したままとなり、LII由来の果皮を四倍体にするにより種子数が減少し、果皮が厚くなり、これまでにないキンカンの品種(‘べにまる’品種登録出願中)を育成した(図1参照)。



このように、合成周縁キメラ育種は異質遺伝子型だけでなく、倍数体を組み合わせることで独創的な育種を創造することができ、これまでの交雑育種法や倍数性育種法の限界を超えられるものと推測される。しかしながら、合成周縁キメラ植物体は、その頻度の低さから一般的な育種法にはなっていない。

そこで、本研究では、GUS形質転換体と倍数体を組み合わせて、細胞遺伝学及び組織発生学的な解析を行い、合成周縁キメラ化の原因や初期の発達ステージを明らかにし、周縁キメラ植物体の効率的な作出について検討した。本研究の成果により、これまでに捨てられていた倍数体育種母本(たとえば、種なし、果皮も薄い三倍体など)が見直され、それとオレンジとの合成周縁キメラ化により即品種の可能性がでてくる。つまり、果皮と果肉の別々で選抜・育種し、その後合成周縁キメラ化するという新しい育種法が確立され、他の果樹でも応用されるようになることが期待される。

平成20年3月

研究代表者  
宮崎大学農学部  
國武 久登

#### 研究組織

研究代表者	宮崎大学農学部応用生物科学科	國武 久登
研究分担者	宮崎大学農学部応用生物科学科	西山 和夫
研究協力者	静岡大学農学部附属地域フィールド 科学教育研究センター	八幡 昌紀
	宮崎大学大学院農学工学総合研究科	安田 喜一
	宮崎大学農学部学生	松山 ちひろ

## 研究経費

平成17年度	1,500	千円
平成18年度	800	千円
平成19年度	1,000	千円
計	3,300	千円

## 研究発表

### 学術誌等

- 1) 安田 喜一、國武 久登、中川 匠子、黒木 宏憲、八幡 昌紀、平田 力也、吉倉 幸博、川上 郁夫、杉本 安寛：ニンポウキンカン‘勇紅’の倍数性周縁キメラの証明とその形態的特性、園芸学研究、7(2)：165-171 (2008)
- 2) Yahata, M., H. Kunitake, K. Yasuda, K. Yamashita, H. Komatsu, R. Matsumoto, Production of sexual hybrid progenies for clarifying the phylogenetic relationship between *Citrus* and *Citropsis* species., *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 131(6): 764-769 (2006)
- 3) Yahata, M., H. Kunitake, T. Yabuya, K. Yamashita, Y. Kashiwara, H. Komatsu, Production of a doubled haploid from a haploid pummelo using colchicine treatment of axillary shoot buds. *J Amer Soc Hort Sci*, 130(6): 899-905 (2005)
- 4) Takami, K., A. Matsumaru, M. Yahata, H. Kunitake and H. Komatsu: Utilization of intergeneric somatic hybrids as an index discriminating taxa in the genus *Citrus* and its related species. *Sexual Plant Reproduction*, 18(1): 21-28 (2005)
- 5) 河瀬 憲次、八幡 昌紀、中川 匠子、原口 加奈、國武 久登：ニンポウキンカンにおける同質四倍体の選抜とその特性、園芸学研究、4(2)：141-146 (2005)
- 6) Yahata, M., H. Kurogi, H. Kunitake, K. Nagano, T. Yabuya, K. Yamashita and H. Komatsu: Evaluation of reproductive function in a haploid pummelo by crossing with several diploid citrus cultivars. *J Japan Soc Hort Sci*, 74(4): 281-287 (2005)

### 学会発表

- 1) 國武久登・安田喜一・八幡昌紀・横山 進・小松 春喜：‘清見’タンゴールとニンポウキンカンとの属間雑種の育成、園芸学研究、第6巻別冊2、p.442、2007年
- 2) 安田喜一・八幡昌紀・松本亮司・國武久登：近縁カンキツ類 *Citropsis schwienfurthii* と‘南風’タンゴールとの交雑における花粉管伸長の観察、園芸学研究、第6巻別冊2、p.443、2007年
- 3) Yahata, M., H. Kunitake, K. Yamashita, H. Komatsu: Morphological characteristics of fruit in a haploid pummelo., 第27回国際園芸学会、p.447、2006年
- 4) 八幡昌紀・安田喜一・山下研介・小松春喜・松本亮司・國武久登：近縁カンキツ類 *Citropsis schwienfurthii* と栽培品種との正逆交雑による属間雑種の作出、園芸学会平成18年度春季大会、第75巻別冊1、p261、2006年。
- 5) Kunitake, H. Characterization of ploidy periclinal chimera in a mutant of Meiwa kumquat (*Fortunella crassifolia* Swingle) : Japan/Taiwan Symposium Application of Biotechnology to Horticulture Industry, 2006年

- 6) Yasuda, K., H. Kunitake: Morphological characteristics of a haploid pummelo (*Citrus grandis* Osb.) and its reproductive function. : Japan/Taiwan Symposium Application of Biotechnology to Horticulture Industry, 2006年 (招待講演)
- 7) 八幡昌紀・平井孝宏・國武久登・藪谷勤・山下研介・小松春喜: 半数体ブンタンの配子形成の異常、園芸学会平成17年度秋季大会, 第74巻別冊2, p.335, 2005年.
- 8) 國武久登・原口加奈・八幡昌紀: キンカン属植物における系統分類に関する研究、園芸学会平成17年度秋季大会, 第74巻別冊2, p.110, 2005年.
- 9) 國武久登・中川匠子・黒木宏憲・八幡昌紀・平田力也・吉倉幸博・川上郁夫・杉本安寛: ニンポウキンカン突然変異体の倍数性周縁キメラの証明とその果実特性、園芸学会平成17年度春季大会, 第74巻別冊1, p.75, 2005年.

研究成果による産業財産権の出願・取得状況

- 1) 國武 久登: 発明の名称: ニンポウキンカン等のミカン科植物における  $2x \cdot 4x \cdot 4x$  の組織起源層からなる倍数性周縁キメラ植物体、及びその作出方法、特願 2004-235136、提出日: 平成16年8月12日 (特許申請中)

## 目 次

緒言	1
I. マイクロサージェリー法による倍数性周縁キメラ植物体の作出に関する 基礎的研究	4
1) 試験管内接ぎ木個体からの不定芽分化に及ぼす植物成長調節物質の影響	
2) 試験管内接ぎ木個体からのカルス増殖過程および不定芽分化の組織学的観察	
3) 試験管内接ぎ木個体からのカルス増殖および不定芽分化過程の電子顕微鏡観察	
II. 成長点組織を材料としたマイクロサージェリー法によるキメラ組織形成の試みと GUS 形質転換体を利用した発生起源の解析	
1) 成長点組織を材料としたマイクロサージェリー法によるキメラ組織形成の試み	
2) GUS 形質転換体を利用した発生起源の解析	
総合考察	23
研究発表 学術誌等 (公表論文再録)	24
研究成果による産業財産権の出願	65

## 緒 言

カンキツ類とは一般に、植物分類学上、ミカン科 (*Rutaceae*), ミカン亜科 (*Aurantioideae*) に属するカンキツ (*Citrus*) 属, キンカン (*Fortunella*) 属, カラタチ (*Poncirus*) 属の植物を指す。これらは、世界の重要な果樹の一つとして亜熱帯から温帯に至る広い地域で栽培されている。これらカンキツ類の祖先は、ミカン亜科に属するシトロプシス属 (*Citropsis*) で約 3,000 万年前にインドのアッサム地方において発生し、分化したと考えられている。その後、東南アジアにブンタン (*Citrus grandis* Osbeck), 中国や日本にはミカン (*C. reticulata* Blanco), 地中海沿岸諸国においてシトロン (*C. medica* L.) やレモン (*C. limon* Burm. f.) が発生し、カラタチ属は中国において発生したと考えられている。

本研究の材料であるカンキツ属 (*Citrus*) は、原産地はインド東部のアッサム地方と考えられており、栽培種の多くは、この地から雲南に到る地域で発生した。その基本種としてミカン、ブンタンおよびシトロンが挙げられる。そのうちミカン類は、中国に広がり、その後日本にも伝わり、ウンシュウミカン (*C. reticulata* Blanco) を産み出した。その他にもスイートオレンジ (*C. sinensis*), ミカン、グレープフルーツ (*C. paradisi*) ・ブンタン、レモン・ライム (*C. aurantifolia*) およびそれらの雑種が現在世界に流通するものである。

本研究の主な材料であるキンカン属は、原産地は中華人民共和国の南部地域と考えられている。カンキツ属と異なる点は、葉に網脈がなく、有脂かつ果面が滑らかで、常緑の低木であることや枝が細く密集することがあげられる。我が国の露地栽培では、カンキツ属が 5 月初旬に開花するのに対し、キンカン属は、7 月の開花が多い。また、果実は小さく、10g 内外であり、果皮はやや厚く、橙黄色から濃橙色を呈し、果内当たり 4~5 粒程度で、一般に小さく滑らかで、胚は濃緑色を呈している (廣瀬, 1988)。これまでに、ナガキンカン [*F. margarita* (Lour.) Swingle], マルキンカン [*F. japonica* (Thumb.) Swingle], ナガバキンカン [*F. polyandra* (Ridl.) Tanaka], ニンポウキンカン [*F. crassifolia* Swingle], フクシュウキンカン [*F. obovata* Tanaka] およびマメキンカン [*F. hindsii* (Champ.) Swingle] の 6 種が知られている (Tanaka, 1954; 1969; 1977)。日本には、江戸時代以前に既にマルキンカン、ナガキンカン、マメキンカンが導入されていたという記録が残っており、他の 3 種については、1926 年にニンポウキンカン、1931 年にフクシュウキンカン、そして 1984 年にナガバキンカンがそれぞれ導入されている (廣瀬, 1988)。

現在、経済栽培しているキンカンはニンポウキンカンであり、我が国におけるキンカンの主要な栽培地域は、宮崎県や鹿児島県などの南九州地域で生産されている。しかしながら、多数の品種が育成されているカンキツ属とは対照的に、キンカン属ではニンポウキンカンだけであり、ほとんど品種改良が行われていないのが現状である。これらのキンカンを含むカンキツ類における育種方法として、交雑や突然変異を利用したものなどがあげられる。交雑育種では主に無核性が重視されており、遺伝的不稔現象 (岩政, 1966) を利用して '清見' (西浦, 1983) が、倍数性を利用して三倍体



キンポウキンカンの施設栽培（収穫時期、1月下旬、宮崎県）

の‘ぷちまる’（吉田ら，2000）や‘オロブランコ’（Soost・Cameron，1980）が育成されている。また，人為的な突然変異は熱中性子や放射線照射により誘発され，スタルビー（Hensz，1971）などの無核系品種が作出されている。さらに，登録品種としては存在しないが，果樹の特徴的な育種法として，接ぎ木キメラによる方法が注目されている。

キメラとは，1植物体に2つ以上の遺伝的に異なった組織が混在するものをさしている（Zhouら，2002）。さらに，接ぎ木キメラとは，トマトをイヌホホズキに接ぎ木し（Winkler，1908），その接ぎ木部から出た不定芽に両組織が混在することをさしている。カンキツを含む高等植物の茎頂分裂組織は3層からなり，これらは外側から第Ⅰ層（L-I），第Ⅱ層（L-II），第Ⅲ層（L-III）と呼ばれている。また，第Ⅰ層には表皮系，果肉が由来し，第Ⅱ層は生殖器官（花粉，胚のうおよび珠心），茎の皮層およびフラベドを生じ，第Ⅲ層からは茎の形成層が分化するとみなされている。さらに，キメラには茎頂分裂組織の状態によって3つのタイプが挙げられる。すなわち，茎頂分裂組織のどの層かが変異した「周縁キメラ」，キメラ状の部分がたがいに扇系状の区分を示す「区分キメラ」，キメラ状の部分がたがいに混然としている「混合キメラ」である（第1図）。

カンキツの接ぎ木キメラとして小林ミカンや金柑子温州がある。小林ミカンはナツミカンに温州を接ぎ，折れた接ぎ木部から発生したものである。LⅠが温州でLⅡ，LⅢがナツミカンの組織を持つ周縁キメラである（Yamashita，1983）。また，金柑子温州は金柑子に温州ミカンを高接ぎしたものから発生した。その構成はLⅠが温州ミカン，LⅡ，LⅢが金柑子である（Ueno，1976）。また，ニンポウキンカンの1樹変異として串間市で発見された，大果系突然変異体，串間系は，第2層と第3層が四倍体に変異した倍数性周縁キメラであることが証明された（中川，2004）。これらは偶発的な接ぎ木キメラであるが近年，効率的に，目的の組合せでキメラ植物を育成するために，人為



的な作出方法が研究されている (Clayberg, 1975). 実際に, ‘川野ナツダイダイ’ と ‘福原オレンジ’ との接ぎ木キメラが Kuhara (1989) により作出されている. また, Sugawara ら (2002) は, ‘ハムリンオレンジ’ と温州ミカンを組み合わせた ‘エクリーグ 15’ (品種登録出願番号: 第 14549 号) を育成している. しかし, これは作出する頻度が低い上, 試験管内でないため, 膨大な場所や時間を必要とする問題がある.

Noguchi (1992) は approach-grafted and cultured *in vitro* (AGSC 法) を開発し, キャベツにおいて効率的にキメラ植物を育成することに成功し, コマツナとキャベツの種間でもキメラが得られたことを報告している. 本手法は, 組織または器官からの不定芽形成さえ可能であれば, 幅広い植物種に応用できる可能性がある.

本研究は, カンキツ類の倍数性周縁キメラ植物体の発生過程を明らかにすることにより, キメラ植物体の効率的な作出法を確立すると共に, その生物学的及び育種学的な意義を証明することにある. 材料には, 主にニンポウキンカンの倍数体や $\beta$ -グルクロニダーゼ (GUS) 形質転換体を供試する. 同質倍数性周縁キメラ植物体の育成には, 珠心胚や茎頂に有糸分裂阻害剤の処理を検討し, 異質倍数性周縁キメラ植物体の育成には, 寄せ接ぎ法及び試験管内でのマイクロサージェリー法について検討する. ニンポウキンカンを主な材料とする周縁キメラ植物の育成および解析を行うために, 次のような項目について検討した.

I. マイクロサージェリー法による倍数性周縁キメラ植物体の作出に関する基礎的研究

II. 成長点組織を材料としたマイクロサージェリー法によるキメラ組織形成の試みと GUS 形質転換体を利用した発生起源の解析

## I. マイクロサージェリー法による倍数性周縁キメラ植物体の作出に関する基礎的研究

Noguchi (1992) は approach-grafted and cultured in vitro (AGSC 法) を開発し、キャベツにおいて効率的にキメラ植物を育成することに成功し、コマツナとキャベツの種間でもキメラが得られたことを報告している (第1図). 本手法は、組織または器官からの不定芽形成さえ可能であれば、幅広い植物種に応用できる可能性がある.

そこで、本研究では、カンキツ類において効率的に倍数性周縁キメラを育成するために、AGSC 法を改良したマイクロサージェリー法について検討した. また、接ぎ木した胚軸組織からのカルス形成や不定芽形成について組織切片法や電子顕微鏡により観察した.

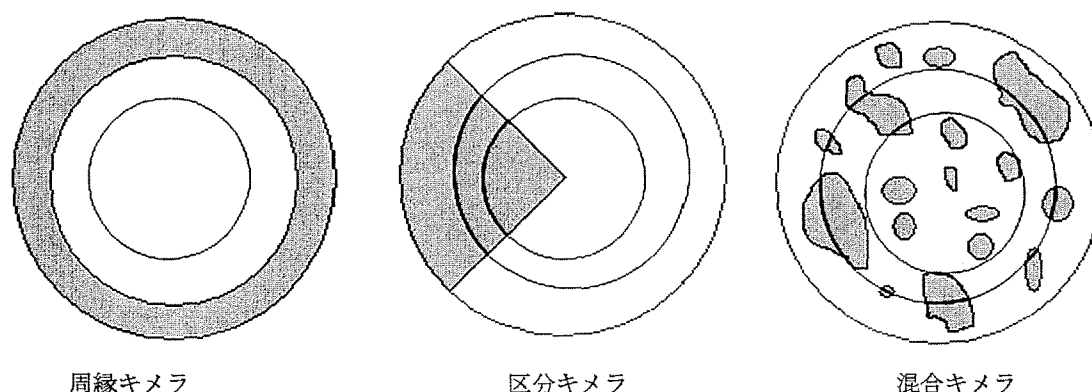
### 実験 1 試験管内接ぎ木個体からの不定芽分化に及ぼす植物成長調節物質の影響

#### 1. 供試材料

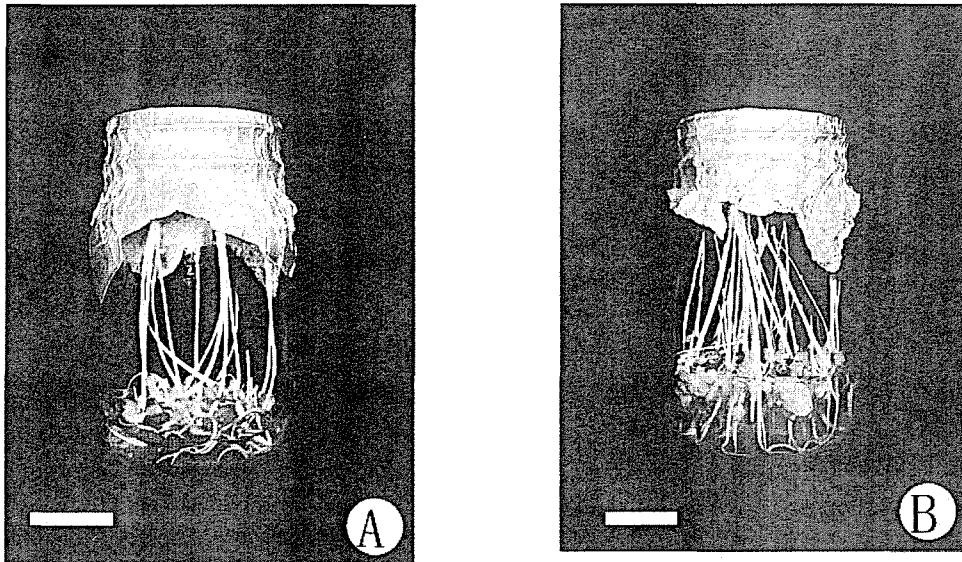
材料には、四倍体および二倍体ニンポウキンカン (*F. crassifolia* Swingle), 二倍体ナツミカン (*C. natsudaidai* Hayata), 二倍体シークワーシャー (*C. depressa* Hayata) の種子を用いた. 試験管内接ぎ木する組み合わせとしては、[四倍体ニンポウキンカンと二倍体ニンポウキンカン], [四倍体ニンポウキンカンと二倍体ナツミカン] および [四倍体ニンポウキンカンと二倍体シークワーシャー] とした.

#### 2. 無菌実生の育成

播種用の培地には、malt extract  $0.5\text{g} \cdot \text{liter}^{-1}$  とゲランガム  $2.5\text{g} \cdot \text{liter}^{-1}$  を添加した 1/2MT (Murashige and Tucker, 1969) 培地を用いた. 培地は、培養瓶 (5cm×11cm) に 50ml ずつ分注し、アルミ箔でふたをして、オートクレーブで滅菌 ( $121^{\circ}\text{C}$ ,  $1.1\text{kg} \cdot \text{cm}^{-2}$ , 15 分間) して用いた. まず、種子の外種皮を剥皮後、1%次亜塩素酸ナトリウムで 5 分間滅菌した後、滅菌水で 3 回水洗いを行い、次亜塩素酸を洗浄した. それを培地に播種し、約 1 ヶ月後、マイクロサージェリー法による試験管内接ぎ木試験に用いた (第2図).



第1図 キメラの三つのタイプ



第2図 植物材料

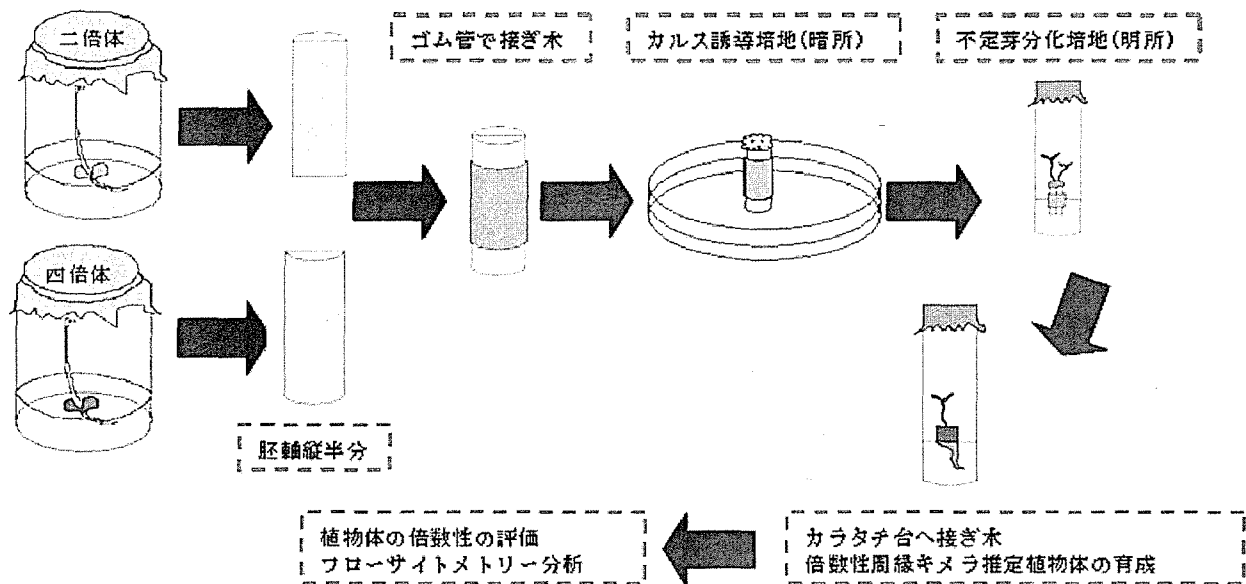
A: 四倍体ニンポウキンカン

B: 二倍体ニンポウキンカン

Bars=3.5cm

### 3. マイクロサージェリー法

Noguchi ら (1992) の AGSC 法を改良したマイクロサージェリー法を用いて、以下の実験を設定した。まず、得られた実生の胚軸を 0.5~0.7 cm の長さに切り分け、縦断した。その後、異なる 2 つの胚軸の縦断面を合わせ接ぎ、胚軸に適当な圧力をかけるために、ゴム管の中に通した (第3図)。次いで、カルス誘導培地に、容器あたり 5 個を中川 (2004) の方法に従い、縦置床した。カルス誘導培地としては、ナフタレン酢酸 (NAA)  $1.0\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$  と 6-ベンジルアミノプリン (BAP)  $1.0\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$  を添加した 1/2MT 培地を用いた。オートクレーブで滅菌後、プラスチックシャーレ ( $8\text{cm} \times 2\text{cm}$ ) に 55ml ずつ分注し、パラフィルムで密封し、試験に用いた。なお、本カルス誘導培地で  $25^\circ\text{C}$  の暗所で 14 日間培養した後、不定芽分化試験に供試した。試験管内接ぎ木組織からの不定芽分化に及ぼす植物成長調節物質の影響を調査するために、NAA と BAP を添加した 1/2MT 培地を用いた。不定芽分化培地には、NAA ( $0\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ ,  $0.1\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ ,  $0.2\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ ) と BAP ( $1\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ ,  $2\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ ,  $5\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ ) の濃度を組み合わせた 9 試験区を設けた。また、試験管 ( $1.2\text{cm} \times 10.5\text{cm}$ ) に 3ml ずつ分注した。培養条件は  $25^\circ\text{C}$  の連続照明条件下で行なった。置床 30 日後と 60 日後に、不定芽形成率を調査し、不定芽を有していた個体の供試数に対する割合 (%) および不定芽を有していた個体あたりの不定芽の平均を算出した。



第3図 マイクロサージェリー法の流れ

得られた不定芽の成長を促進させるために、試験管内接木を行なった。接木の台木として、暗黒下で培養したカラタチ [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] 実生を用いた。カラタチの上胚軸を子葉の上部分約2cmの高さで切り、切断面と垂直に約5mm切り込みを入れた。次いで、カルスから採取した不定芽を、V字型に切り、台木の切り込み部分に差し込んだ。培養は25°Cの連続照明条件下で行なった。

次に、フローサイトメーターによる倍数性の評価を行った。倍数性の解析は河瀬ら (2005) の方法に従った。すなわち、採取した試料に550  $\mu$ l chopping buffer [25 mg propidium iodide (PI), 50 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 140 mM 2-メルカプトエタノール, 1.0% Triton X-100, 50 mM トリス塩酸, 1 ml  $\cdot$  liter<sup>-1</sup> RNase pH7.5] を加え、シャーレ上で約5分間細かく刻み、再び550  $\mu$ l chopping buffer を加えた後、ミラクロス (Calbiochem 社) でろ過した。さらに、ろ液に500 mg  $\cdot$  liter<sup>-1</sup> の PI 溶液を50  $\mu$ l 加えて混合した後、フローサイトメーター [EPICS XL (Coulter 社)] で10,000個の核の蛍光強度を算出した。

## 実験 2 試験管内接ぎ木個体からのカルス増殖過程および不定芽分化の組織学的観察

材料にはニンポウキンカンの二倍体と四倍体の胚軸のみを供試した。マイクロサージェリー法を用いた接ぎ木個体のカルス増殖および不定芽分化過程を観察するために、7 日間隔（接ぎ木直後、カルス誘導培地へ継代 7 日および 14 日、不定芽分化培地へ継代 10 日、17 日、24 日、31 日、34 日、41 日、48 日、55 日および 62 日後）で FAA（70%エタノール：ホルマリン：酢酸=90：5：5）内に 15 個体ずつ固定した。まず、実体顕微鏡 [ZMZ-U ZOOM 1:10 (Nikon 社)] を用いて外観の観察を行なった。続いて、胚軸、カルスおよび不定芽分化過程を観察するために、4%アガロースゲル ME を用いて、縦断した試料の周りを固めた。その後、マイクロスライサー [DOSAKA (EM 社)] を用いて 30~50 $\mu$ m の厚さの切片を作製し、カバーガラスを被せ、プレパラートを作製した。次いで、光学顕微鏡 [BX51 (OLYMPUS 社)] を用いて観察を行なった。

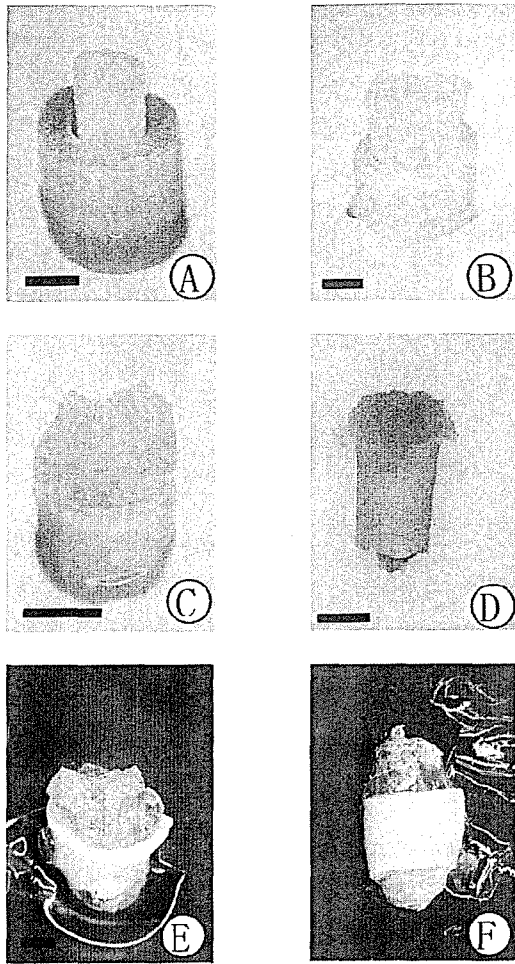
## 実験 3 試験管内接ぎ木個体からのカルス増殖および不定芽分化過程の電子顕微鏡観察

材料には、実験 2 と同様に、ニンポウキンカンの二倍体と四倍体の胚軸を供試した。初期のカルス増殖過程から不定芽分化までの詳細な観察を行うために、実験 2 と同様に、FAA にサンプルを経過時間ごとに固定し、走査型電子顕微鏡 [S-3000V (HITACHI 社)] を用いて観察を行なった。

## 結果および考察

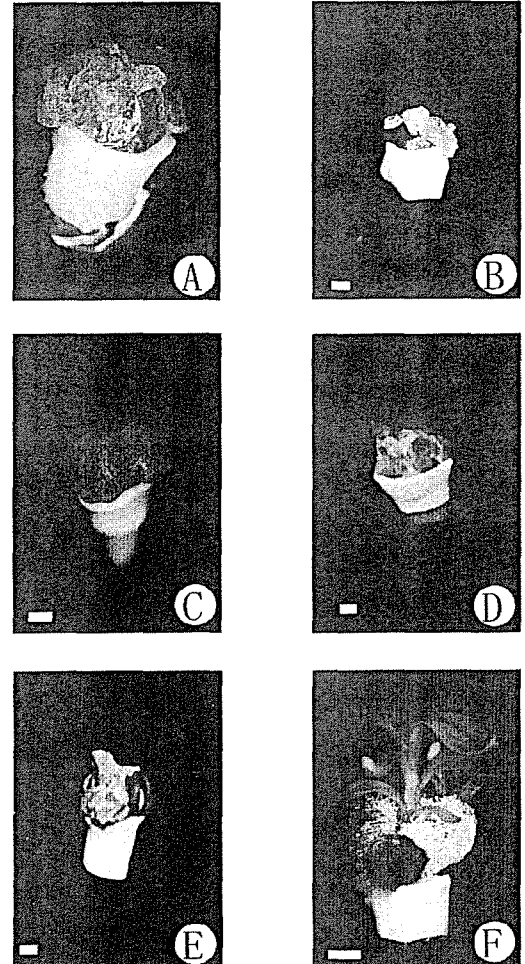
### 実験 1 試験管内接ぎ木個体からの不定芽分化に及ぼす植物成長調節物質の影響

カルス増殖および不定芽分化過程の経時変化の観察を行なった結果を第 4 図と第 5 図に示した。カルス誘導培地において、暗所 7 日後には胚軸がやや膨張し、上部切断面において透明なカルスの初期増殖形態観察された (第 4-B 図)。さらに暗所 14 日後には肉眼で観察できるほどにカルスの増殖がみられた (第 4-C 図)。その後、不定芽分化培地に移植し、明所 10 日後にはカルスが薄く緑色となり、胚軸が確認できない程に柔らかいカルスの急速な増殖が確認された (第 4-D 図)。明所 17 日後には不定芽の形成が顕微鏡下で確認でき (第 4-E 図)、明所 24 日後になると肉眼で確認することができた (第 4-F 図)。さらに、明所 31 日後には約 1mm に不定芽が成長し、その基部のカルスは硬いものであった (第 5-A 図)。また、部分的には緑色を呈する不定芽原基も観察された。それ以後は、不定芽の数が増え (第 5-B~D 図)、移植 62 日後にはカラタチ台へ接げる大きさに成長した (第 5-F 図)。また、カルスの急激な増殖はせず、培地に接触した部分は褐変する傾向が認められた。



第4図 カルス増殖や不定芽分化過程の組織学的観察

A:暗所0日 B:暗所7日 C:暗所14日 D:明所10日  
E:明所17日 F:明所24日 (Bars=1mm)



第5図 カルス増殖や不定芽分化過程の組織学的観察

A:明所31日 B:明所34日 C:明所41日 E:明所48日  
D:明所55日 F:明所62日 (Bars=1mm)

植物成長調節物質の影響を検討するために、不定芽形成率および1試験管内接ぎ木個体あたりの不定芽数の調査を行なった。その結果を第1表に示した。まず、四倍体ニンポウキンカンと二倍体ニンポウキンカンの結果について検討を行なった結果、すべての区においてカルス形成が認められたものの、30日後および60日後の不定芽形成率は、 $1\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$  BAP 添加区でそれぞれ90%、95%と他の試験区より高かった。BAP 単独培地では、BAP の濃度が増加するにつれて、不定芽形成率は減少し、不定芽数は増加した。また、 $0.2\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$  NAA と  $1\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$  BAP を添加した試験区を除くと、NAA が増加すると不定芽形成率は急激に減少した。不定芽数は  $5\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$  BAP を添加した試験区において6.2本となり、最も高い値となった。これからの結果から、四倍体と二倍体のニンポウキンカンの接ぎ木では、BAP を単独で添加した培地で不定芽形成が高いものと考えられる。

第1表 マイクロサージェリー後の接ぎ木個体の不定芽分化  
に及ぼす植物成長調節物質の影響

植物成長調節物質		不定芽形成率 <sup>z</sup> (%)		不定芽数 <sup>y</sup> (本/個体)	
NAA (mg · l <sup>-1</sup> )	BA (mg · l <sup>-1</sup> )	30日後	60日後	30日後	60日後
0.0	1	90	95	3.3	3.8
	2	85	90	3.9	5.1
	5	85	85	4.5	6.2
0.1	1	15	35	1.3	1.7
	2	60	70	3.7	3.9
	5	15	15	2.0	3.7
0.2	1	70	80	4.6	5.4
	2	35	45	2.9	3.6
	5	0	0	0.0	0.0

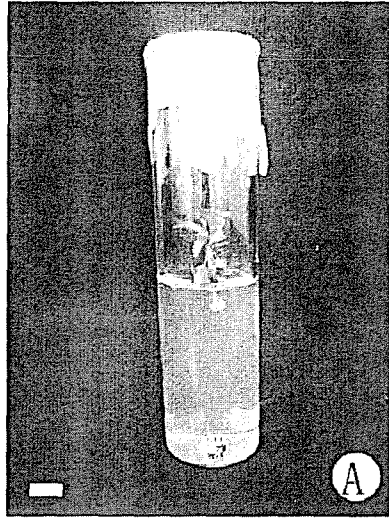
<sup>z</sup>不定芽分化培地で30日と60日培養後に調査  
不定芽を有していた個体/供試数×100

<sup>y</sup>不定芽分化培地で30日と60日培養後に調査  
総不定芽数/不定芽を有していた接ぎ木個体

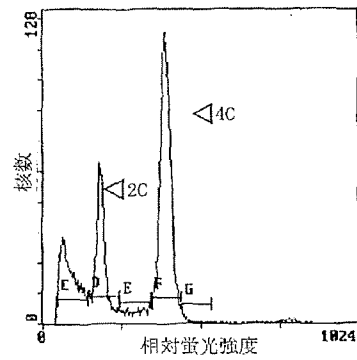
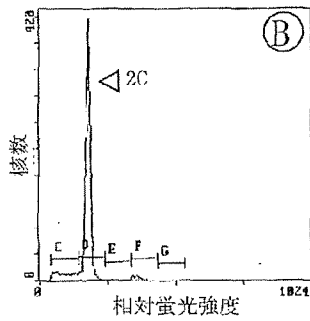
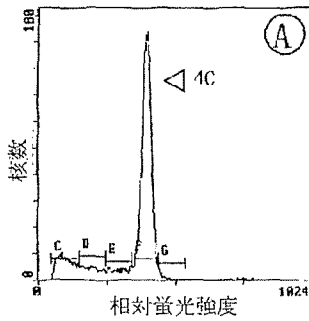
次に、四倍体ニンポウキンカンと二倍体ナツミカンについて検討を行なった結果、0.2mg · liter<sup>-1</sup> NAA と 1mg · liter<sup>-1</sup> BAP を添加した試験区において、30日および60日後共に最も高い不定芽形成率を示し、それぞれ65%と90%であった。0.2mg · liter<sup>-1</sup> NAA と 1mg · liter<sup>-1</sup> BAP を添加した試験区では例外であったが、概してNAAの濃度が高くなるにつれて、不定芽形成率は減少した。不定芽数は30日後、0.1mg · liter<sup>-1</sup> NAA と 1mg · liter<sup>-1</sup> BAP を添加した試験区で4.3本、60日後では1mg · liter<sup>-1</sup> BAP を添加した試験区で7.0本となり、それぞれ最も高かった。これらのことより、四倍体ニンポウキンカンと二倍体ナツミカンにおける不定芽形成の最適条件は、0.2mg · liter<sup>-1</sup> NAA と 1mg · liter<sup>-1</sup> BAP を添加した培地条件であると考えられる。

最後に、四倍体ニンポウキンカンと二倍体シークワシャーについて検討を行なった結果、30日後、0.2mg · liter<sup>-1</sup> NAA と 2mg · liter<sup>-1</sup> BAP を添加した試験区が65%、60日後では1mg · liter<sup>-1</sup> BAP を単独で添加した試験区が70%と最も高い不定芽形成率を示した。また、不定芽数は、30日後では、0.2mg · liter<sup>-1</sup> NAA と 5mg · liter<sup>-1</sup> BAP を添加した試験区で3.2本、60日後では0.2mg · liter<sup>-1</sup> NAA と 2mg · liter<sup>-1</sup> BAP を添加した試験区で3.6本が最高値となった。これらのことより、四倍体ニンポウキンカンと二倍体シークワシャーにおける不定芽形成の最適条件は、0.2mg · liter<sup>-1</sup> NAA と 2mg · liter<sup>-1</sup> BAP を添加した培地条件であると考えられる。

Durman-vila ら (1989) は、カンキツ属植物における茎からの不定芽形成に関して、1mg · liter<sup>-1</sup> BAP 区、および 3mg · liter<sup>-1</sup> BAP 区が最適であったことを報告している。また、中川 (2004) はキンカン属植物において、BAP を単独で添加した培地で高い不定芽形成率が得られたことを報告している。本研究でも、ニンポウキンカンの二倍体と四倍体の組合せではBAP単独培地の不定芽形成率が高かった。しかしながら、他の組合せでは、必ずしもBAP単独培地で高くはなかった。Durman-vila ら (1989) は、不定芽の成長には、材料として使用した遺伝子型もその要因の一つであることを報告している。本研究でも遺伝子型の組合せの違いにより、最適条件も異なった。本研究では材料とした胚軸単独における不定芽形成率の試験は行っ



第6図 試験管内接ぎ木した倍数性周縁キメラ推定植物体  
A, B=カラタチ台に接ぎ木後30日 (Bar=1cm)



第7図 フローサイトメトリーによる倍数性の評価

A: 四倍体  
B: 二倍体

第8図 フローサイトメトリーによる接ぎ木部分におけるカサの倍数性の評価

第2表 倍数性周縁キメラ推定植物体の倍数性の評価

組み合わせ	供試数	倍数性			
		四倍体 (%)	二倍体 (%)	四倍体・二倍体 (%)	未 (%)
四倍体ニンポウキンカン・二倍体ニンポウキンカン	55	15 (27.2)	30 (54.6)	0 (0.0)	10 (18.2)
四倍体ニンポウキンカン・二倍体ナツミカン	62	8 (12.9)	34 (54.8)	0 (0.0)	20 (32.3)
四倍体ニンポウキンカン・二倍体シークワシャー	2	1 (50.0)	1 (50.0)	0 (0.0)	0 (0.0)



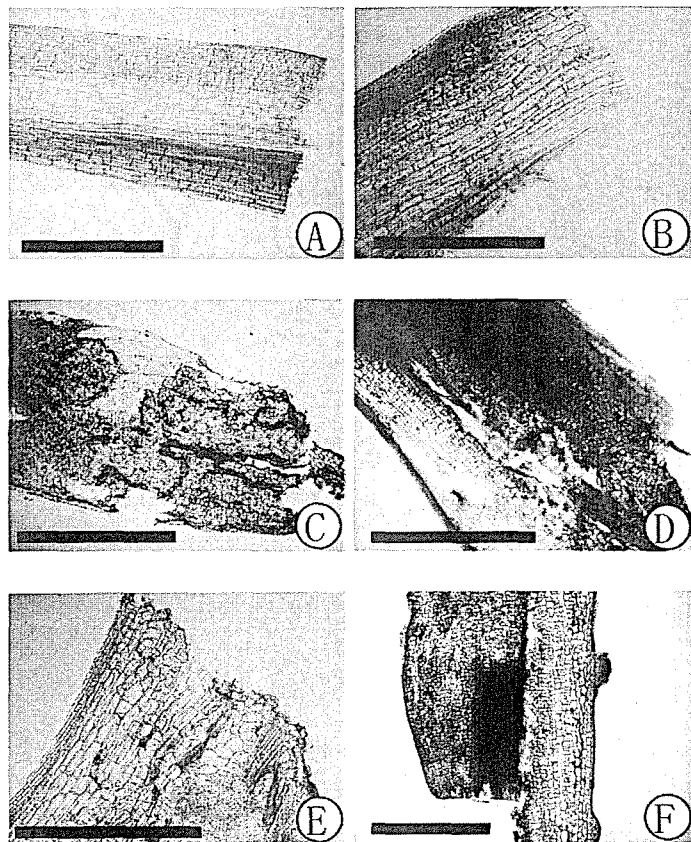
ておらず、それぞれの遺伝子型の特徴は不明であるが、高い不定芽形成能力を有するもの同士の組合せがよいものと推測される。今後は、カンキツ類において不定芽形成能力の高い品種を選抜して比較検討を行なう必要がある。

試験管内接ぎ木2ヶ月後、得られた不定芽をカラタチ台に接ぎ木を行い（第6図）、1ヶ月以上経過した植物体の葉について倍数性評価を行った。その結果を第7図と第2表に示した。その結果、すべての組合せにおいて、目的とした四倍体と二倍体のキメラ個体を得られることはできなかった。四倍体ニンポウキンカンと二倍体ニンポウキンカンにおいて、二倍体が54.5%、四倍体が27.2%であった。四倍体ニンポウキンカンと二倍体ナツミカンでは、二倍体が54.8%、四倍体が12.9%であった。さらに、四倍体ニンポウキンカンと二倍体シークワーシャーでは二倍体と四倍体が1個体ずつ観察された。以上のことは、芽の初期成長が二倍体の方が早いために、接ぎ木した個体のほとんどが二倍体であった可能性が高いのではないかと思われる。また、接ぎ木個体から形成されたカルスのみの評価を行なった結果、すべての個体から、両胚軸由来のカルスが形成されていたことを確認できた（第8図）。すなわち、カルス形成は両遺伝子型から発生していることは明らかである。今後得られる不定芽を接ぎ木・育成していけば、キメラ個体を得られる可能性が高いものと考えられる。

## 実験2 試験管内接ぎ木個体からのカルス増殖過程および不定芽分化の組織学的観察

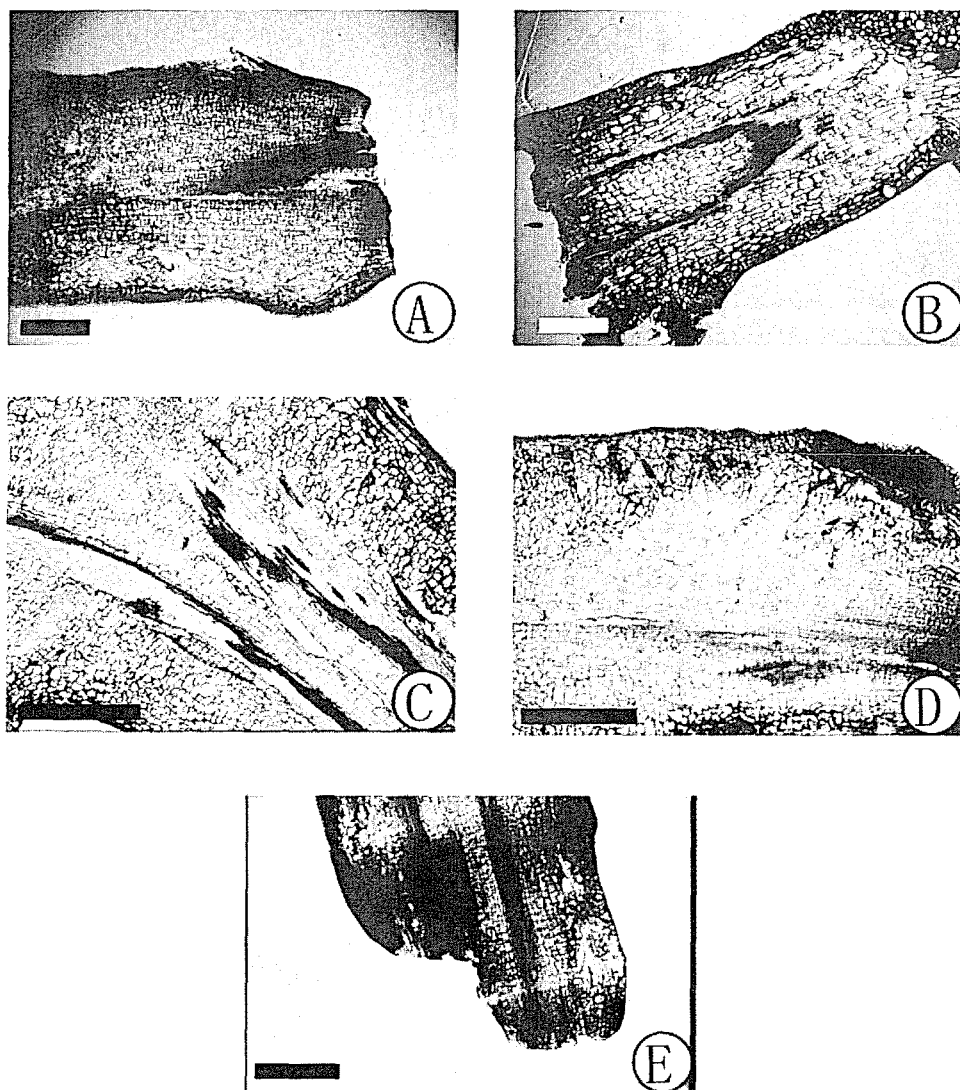
マイクロライザーを用いて、胚軸の上部および下部におけるカルス形成過程の観察を行なった結果（第9~12図）、7日後までに両胚軸の密着は観察されず、前述したように実体顕微鏡下では胚軸の肥大が認められたが、組織切片では何の変化も認められなかった（第9-B図）。

しかしながら、暗所14日以降、両胚軸は密着しており、ゴム管を外した後も両胚軸は離れず、両胚軸の癒着が確認された。胚軸の接着面にカルスの増殖は認められなかったが（第9-C~F図、第10-A~E図）、両胚軸を離そうとすると、裂けるように離れた。



第9図 胚軸下部の縦断面

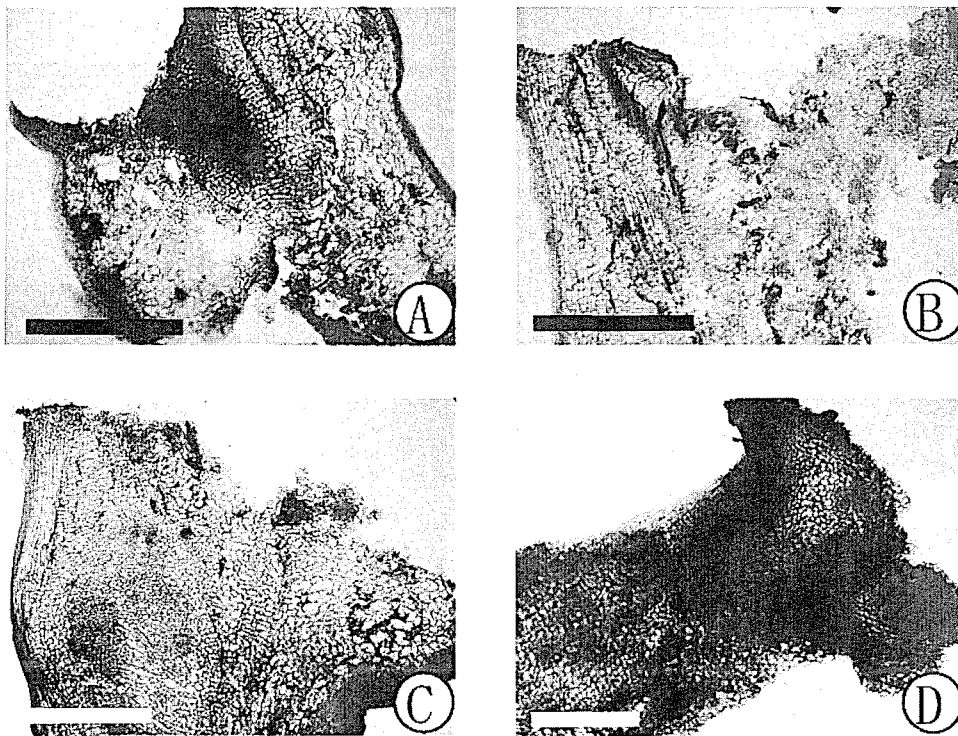
A:暗所0日 B:暗所7日 C:暗所14日 D:明所10日  
E:明所17日 F:明所24日 (Bars=0.5mm)



第10図 胚軸下部の縦断面

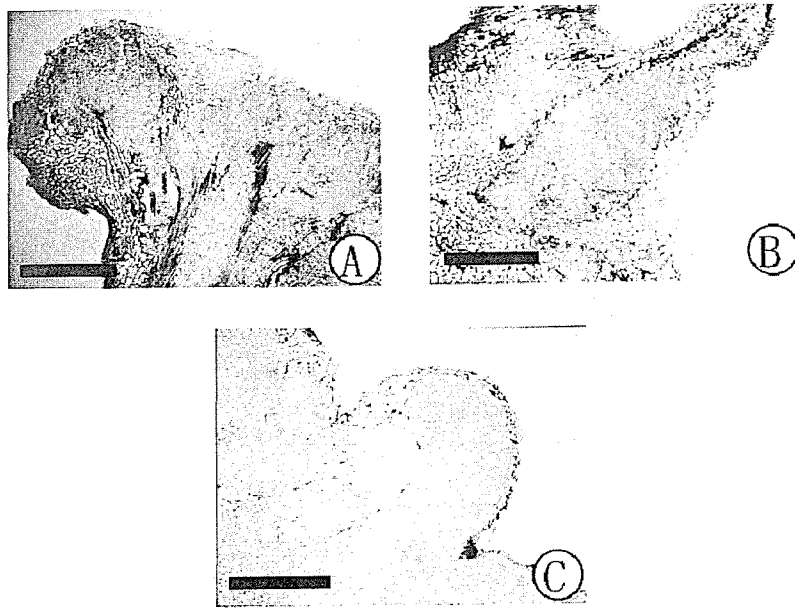
A: 明所31日 B: 明所41日 C: 明所48日  
 D: 明所55日 E: 明所62日 (Bars=0.5mm)

一方、胚軸上部の観察を行なった結果、明所 10 日以降にカルスの形成がみられた (第 11-A 図)。明所 10 および 17 日までは、胚軸からのカルスが崩れる傾向が観察された (第 11-A,B)。そのカルスは、両胚軸から直接形成されており (第 11-D 図)、その間に両胚軸由来の細胞が密着する部分があるものと考えられる。最後に、不定芽形成を観察した結果を第 13 図に示した。実体顕微鏡を用いて観察を行なった結果、不定芽はカルスから直接形成されていた (第 13-A,D 図)。さらに、不定芽を縦断した結果、両胚軸から形成されたカルスから不定芽が形成されていたことを確認した (第 13-B,E 図)。マイクロスライサーを用いて不定芽形成を観察した結果、胚軸もしくはそのカルスから形成されていることが確認できた (第 13-C,F 図)。



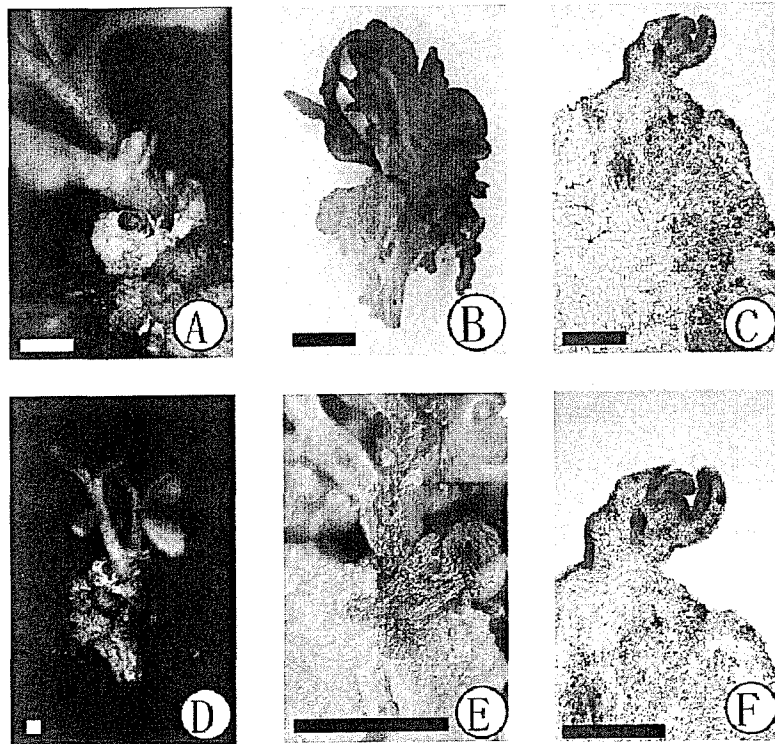
第11図 胚軸上部の縦断面

A: 明所10日 B: 明所17日 C: 明所24日 D: 明所31日 (Bars=1mm)



第12図 胚軸上部の縦断面

A: 明所41日 B: 明所55日 C: 明所62日 (Bars=1mm)



第13図 不定芽分化の様子

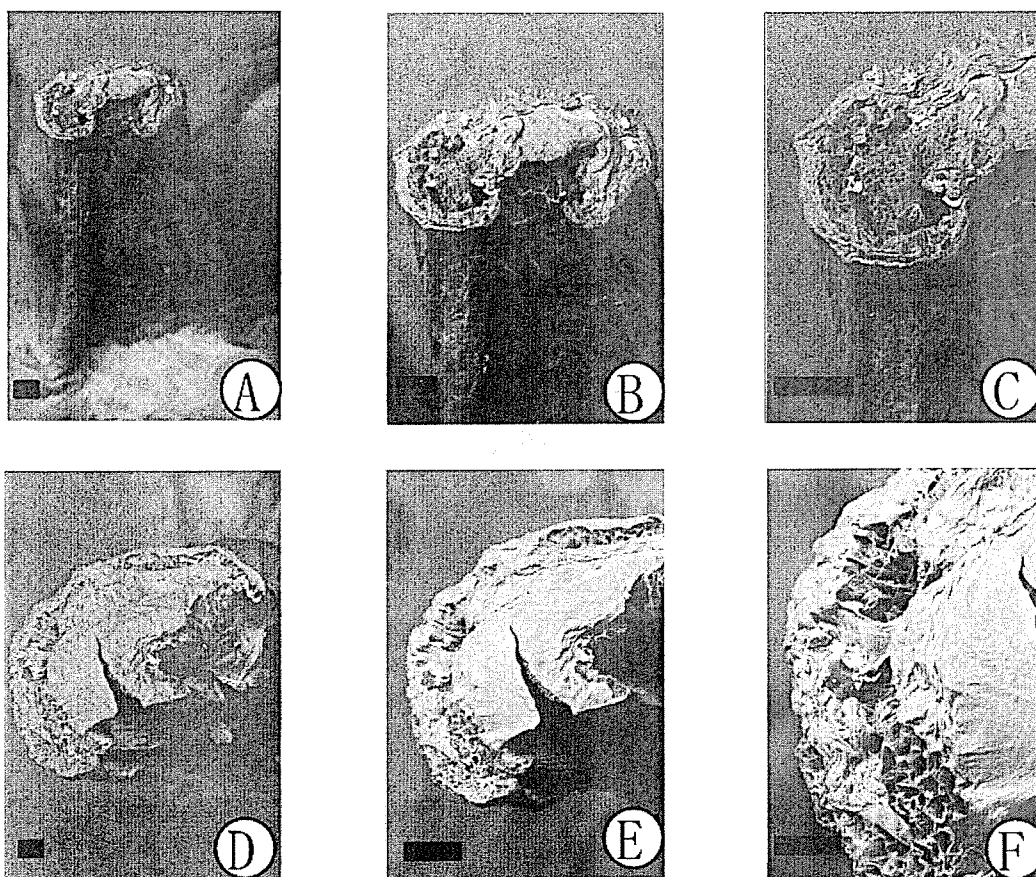
A, D: 多芽体の外観 (Bar=1mm)

B, E: 多芽体の断面 (Bar=0.5mm)

C, F: 不定芽 (Bar=1mm)

### 実験3 試験管内接ぎ木個体からのカルス増殖および不定芽分化過程の電子顕微鏡観察

試験管内接ぎ木個体からのカルス増殖および不定芽分化過程の電子顕微鏡観察を行ったところ(第14図), 暗所10日後には, 初期のカルスが切断面を覆うように発生していることが観察された(第14-A~C図). しかしながら, この現象は胚軸上部だけであり, 縦断面にはまったくその傾向は認められなかった. さらに, 14日後になると胚軸上部のほとんどがカルスに覆われていることが観察された(第14-D~F図). 以上のように, 胚軸組織を材料として, 試験管内接ぎ木を行うマイクロサージェリー法により, 倍数性キメラ個体の作出について検討したが, 現在までに得られた個体は, 二倍体または四倍体であり, すべて単独に発生しているものであった. これは, 二倍体不定芽の成長が早いことが原因と考えられ, これから得られる不定芽が重要になるものと考えられる.



第14図 胚軸の断面

A, B, C: 暗所10日 D, E, F: 暗所14日 (Bars 100  $\mu$ m)

## II. 成長点組織を材料としたマイクロサージェリー法によるキメラ組織形成の試みと GUS 形質転換体を利用した発生起源の解析

第 I 章において、実生の胚軸組織を利用して、マイクロサージェリーを行い、倍数性周縁キメラ個体の作出を試みた。しかしながら、カルスレベルでの癒合組織は得られたが、そこから由来したと考えられる新たな不定芽の作出には至らなかった。そこで、無菌実生の成長点付近の組織を材料としてマイクロサージェリーを試み、倍数性キメラ個体の作出を試みた。また、GUS 形質転換体を用い、同様な手法を用い、発生起源の解析を行った。

### 実験 1. 成長点組織を材料としたマイクロサージェリー法によるキメラ組織形成の試み

#### 1. 供試材料

材料には、第 1 章と同様に、四倍体および二倍体ニンポウキンカンの種子を用いた。

#### 2. 無菌実生の育成

第 1 章と同様の方法で無菌の実生を育成した。

#### 3. マイクロサージェリー法と FCM による倍数性評価

第 1 章に示したマイクロサージェリー法を用いて、以下の実験を設定した。まず、得られた実生の胚軸を 0.5~0.7 cm の長さに切り分け、縦断した。その後、異なる 2 つの腋芽の成長点部の縦断面を合わせ接ぎ、ゴム管の中に通した。カルスおよび不定芽誘導培地としては、6-ベンジルアミノプリン (BAP) 0, 1.0, 2.0, 5.0, および 10.0 mg · liter<sup>-1</sup> を添加した 1/2MT 培地を用いた。置床 30 日後と 60 日後に、不定芽形成率を調査し、不定芽を有していた個体の供試数に対する割合 (%) および不定芽を有していた個体あたりの不定芽の平均を算出した。

次に、得られた不定芽は第 1 章と同様の方法で、フローサイトメーターによる倍数性の評価を行った。倍数性の解析は河瀬ら (2005) の方法に従った。すなわち、採取した試料に 550  $\mu$ l chopping buffur [25 mg propidium iodode (PI), 50 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 140 mM 2-メルカプトエタノール, 1.0% Triton X-100, 50 mM トリス塩酸, 1 ml · liter<sup>-1</sup> RNase pH7.5] を加え、シャーレ上で約 5 分間細かく刻み、再び 550  $\mu$ l chopping buffer を加えた後、ミラクロス (Calbiochem 社) でろ過した。さらに、ろ液に 500 mg · liter<sup>-1</sup> の PI 溶液を 50  $\mu$ l 加えて混合した後、フローサイトメーター [EPICS XL (Coulter 社)] で 10,000 個の核の蛍光強度を算出した。

### 実験 2. GUS 形質転換体を利用した発生起源の解析

#### 1. 供試材料

材料には、二倍体ニンポウキンカンの GUS ( $\beta$ -glucuronidase) 形質転換体の試験管内個体 (接ぎ木繁殖) を供試した。また、片親にはカラタチの珠心胚実生を供試した。GUS 形質転換体の誘導・維持には、口石ら (2006) の方法により誘導したものである。つまり、アグロバクテリウム溶液に上胚軸切片を浸漬し、7 分間静置した。アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) の菌株には EHA105 (Hood *et al.* 1993), プラスミドには pIG121Hm (Ohta *et al.* 1990) を供試した。その後、ろ紙を敷いた 1 mg liter<sup>-1</sup> 2,4-

ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D), 1 mg liter<sup>-1</sup> 6-ベンジルアミノプリン (6-BA), 20 mg l<sup>-1</sup> アセトシリニンゴン, 10 g liter<sup>-1</sup> スクロースおよび 3 mg liter<sup>-1</sup> ゲランガムを含む 1/2MS 培地 (以後, 共存培地とする) に移し, 25°C, 暗所で 4 日間培養した. 共存培養後, 1 mg liter<sup>-1</sup> ナフタレン酢酸 (NAA), 1 mg liter<sup>-1</sup> 6-BA, 20 mg liter<sup>-1</sup> アセトシリニンゴン, 30 g liter<sup>-1</sup> スクロースおよび 3 g liter<sup>-1</sup> ゲランガムを含む 1/2MS 選抜培地に移し, 25°C, 暗所で 1 か月間培養した (以後, 1 次選抜培地とする). 次に, シュート再生を促すために, 胚軸切片を 2 mg liter<sup>-1</sup> 6-BA, 100 mg liter<sup>-1</sup> カナマイシン, 500 mg liter<sup>-1</sup> クラフオラン, 30 g liter<sup>-1</sup> スクロースおよび 3 g liter<sup>-1</sup> ゲランガムを含む 1/2MS 培地 (以後, 2 次選抜培地とする) に移植し, 25°C, 連続照明下で培養し, GUS 形質転換体を誘導した.

マイクロサージェリーによるキメラ個体の作出には, 第 I 章と同様な方法で行った. 1~2 ヶ月後, カルスまたは不定芽が形成され外植体は, GUS 染色による組織学的観察を行った. GUS 発現の調査は, Jefferson *et al.* (1987) の方法に従い, 移植 1 ヶ月後に行った. 検定はシュートが分化した胚軸切片を 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (X-gluc) 染色液 (1.9 mM X-Gluc, 0.5 mM K<sub>3</sub>Fe (CH)<sub>6</sub>, 0.5 mM K<sub>4</sub>Fe(CH)<sub>6</sub>, 0.3% TritonX-100, 20% メタノール, 100 mM リン酸バッファー-pH 7.0) に浸し, 37°C で 12 時間反応させた. その後, 70% エタノールに入れて 48 時間脱色し, GUS 遺伝子の発現を観察した.

なお, 形質転換体の取り扱いについては, DNA 実験安全委員会規程に従って実施し, 実験後はすべてオートクレーブにおいて処分した.

## 結果および考察

### 実験 1. 成長点組織を材料としたマイクロサージェリー法によるキメラ組織形成の試み

腋芽の成長点付近の接ぎ木は, 胚軸を接ぎ木した場合よりも, カルスやシュートの形成が早く, 約 1 週間で動きが観察された. 成長点組織の接ぎ木個体からのカルスおよびシュート形成に及ぼすサイトカイニンの影響について調査したところ (第 3 表), BA 無添加の対照区を除くと, BA 濃度が高くなるにつれて, シュート形成率およびシュート形成数が増加した. 特に, 10 mg liter<sup>-1</sup> 6-BA を添加した区では, 100% のシュート形成率であり, 2 ヶ月後には 1 外植体あたり 4.3 本のシュートが観察された. 一方, カルス形成はすべての処理区で認められた.



第 15 図 成長点組織のマイクロサージェリーからのシュート形成

第3表 成長点組織の接ぎ木個体からのカルスおよびシュート形成に及ぼすサイトカイニンの影響

	シュート形成率(%)		シュート形成数		カルス形成率(%)	
	30日	60日	30日	60日	30日	60日
0	100	100	2.0	2.3	10	50
1	80	80	1.6	1.6	20	70
2	90	90	2.5	2.7	10	50
5	80	80	2.1	2.5	30	100
10	100	100	3.8	4.3	40	60

次に、成長点組織の接ぎ木個体から得られたシュートの FCM 解析による倍数性評価を行った。得られたすべてのシュートについて調査したが、二倍体または四倍体のピークのどちらかであり、倍数性キメラ個体は得られなかった。

#### 実験 2. GUS 形質転換体を利用した発生起源の解析

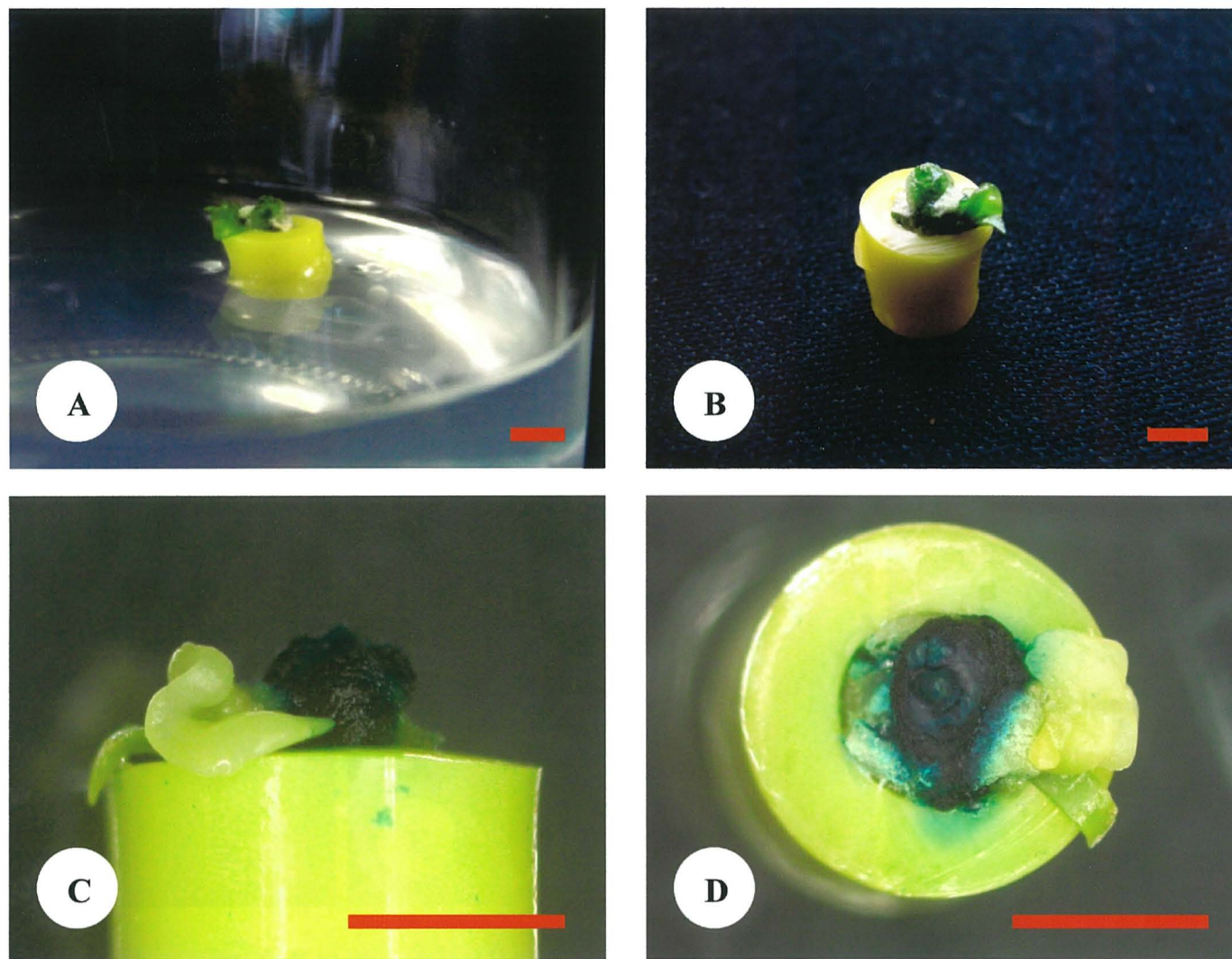
約 2 週間後には GUS 形質転換体とカラタチの活着が認められ、切断面の表面にはカルスまたは初期のシュートが確認された (第 16 図 A,B)。GUS 染色を行ったところ、半分は濃く染色され、片方は染色されなかった (第 16 図 A,B)。おそらく、染色されたものはニンポウキンカンの組織であり、染色されなかったものはカラタチの組織と思われる。やや色素が広がる傾向が認められたが、2つの組織をしっかりと判別することができた。

約 1 か月後、カルスはさらに増殖し、完全なシュートの再生が確認された。カルスは水浸状のものと同様にコンパクトなもの2種類観察された (第 17 図 A~C)。再生したシュートはすべて三出葉を示し、カラタチの切片から出てきているものと推測された (第 17 図 D~F)。

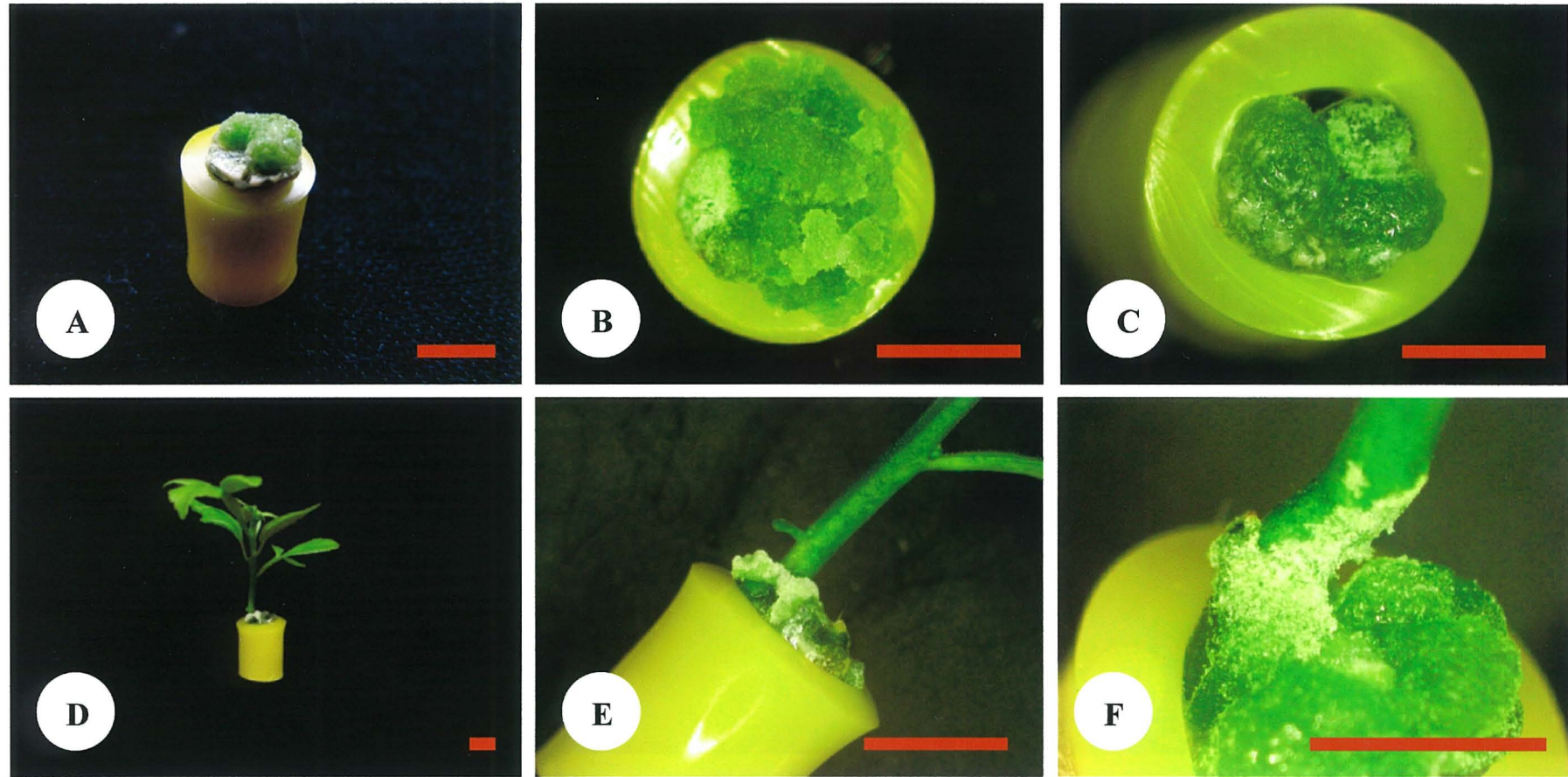
次に、植物体が再生した外植体について GUS 調査を行った。縦断切片したものを第 18 図 A~C に示した。GUS 染色により、2週間後の結果と同様に、2つの組織を識別することができたが、形質転換体のずい組織は染色されなかった。また、詳細な観察から2つの遺伝子型由来カルスまたは組織の細胞レベルの交換 (混合) はほとんど起きていないように観察された。再生した植物体の先端や幼葉の一部が青く染色されていたが (第 18 図 D~F)、この原因として細胞から出てきた色素が切断面等についたものと思われる。

さらに、カルスが旺盛に増殖した外植体について GUS 調査を行った。旺盛なカルス増殖が示された組織は濃く染色され、ニンポウキンカンのものであった (第 19 図 A)。コンパクトなカルスはほとんど染色されなかった (第 19 図 B)。また、横断面をとって見たが、前述したように、両組織のカルスまたは組織が混じり合うような現象はまったく観察されなかった (第 19 図 C,D)。さらに、細胞を拡大してみたが、これ以上の細胞の様子をうかがうことは不可能であった (第 19 図 E,F)。また、カラタチの維管束部に浸透したと思われる薄い染色が確認された。



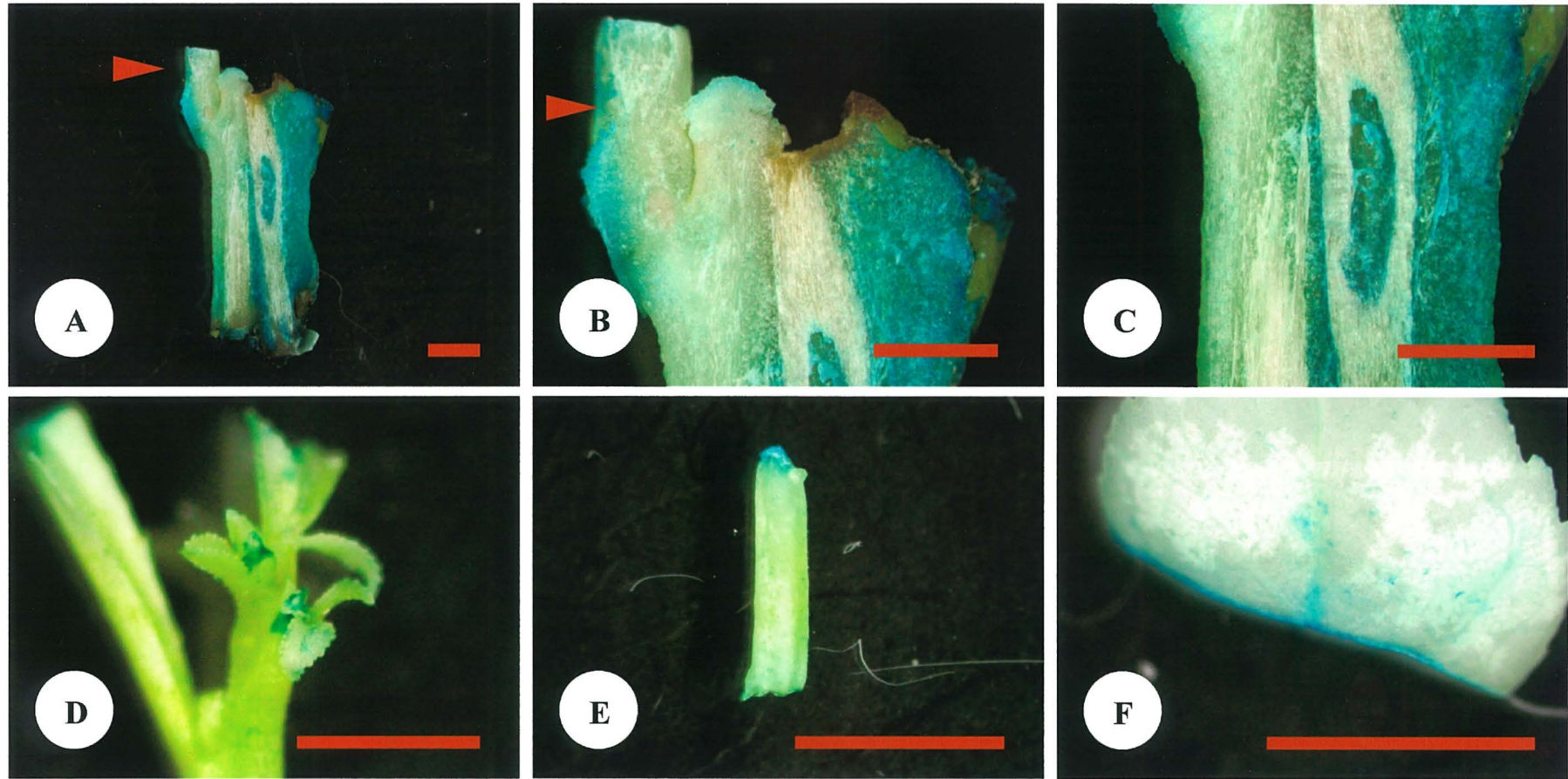


第16図 マイクロサージェリー2週間後の外植体とGUS発現  
A, B: 活着が確認されたサンプル, C, D: GUS発現 (Bars = 2.5 mm)

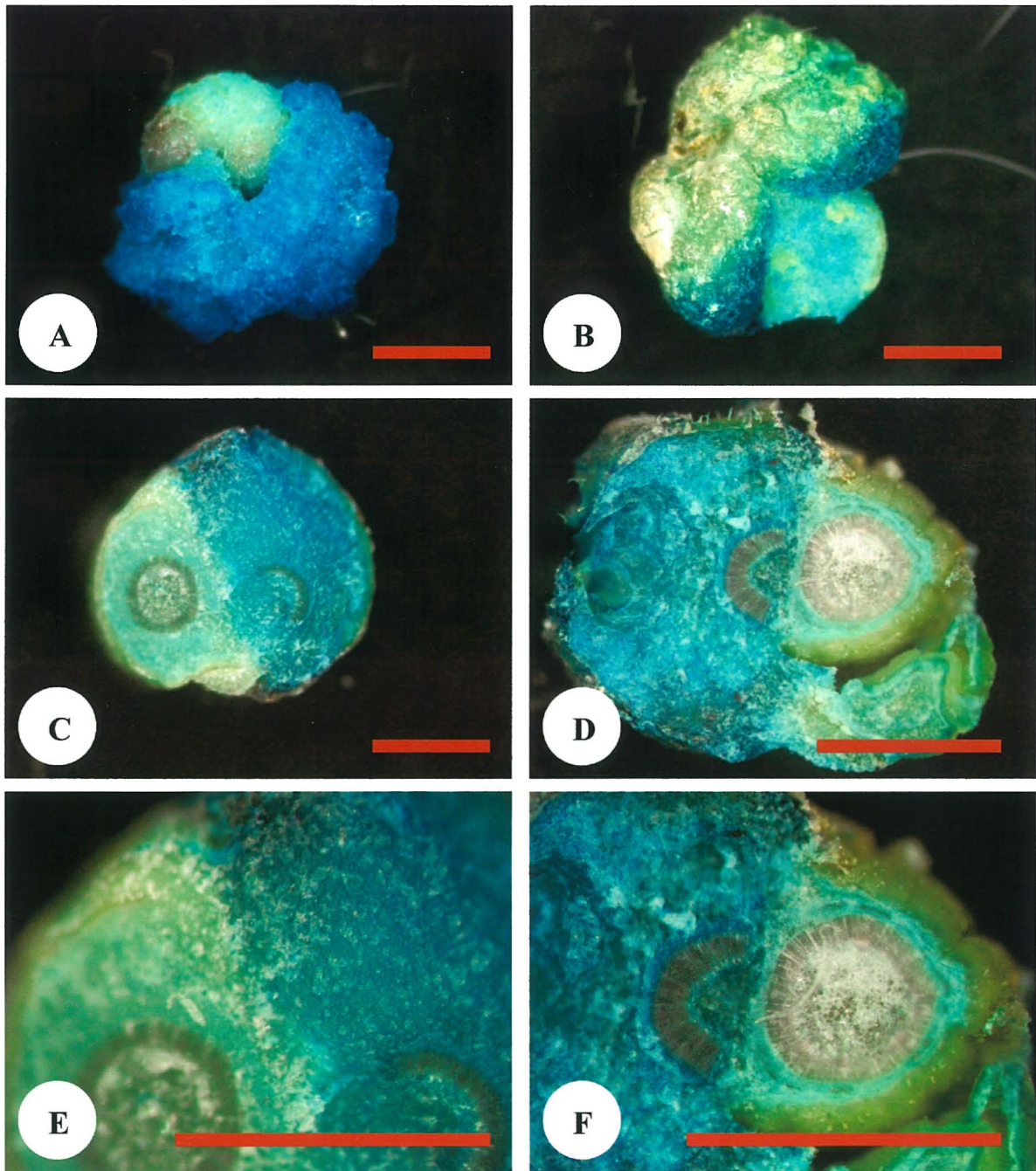


第17図 マイクロサージェリー1ヶ月後のサンプル  
A~C: カルス再生個体, D~F: 植物体再生個体

(Bars = 2.5 mm)



第18図 マイクロサージェリー1ヶ月後の植物体再生個体におけるGUS発現  
A~C: 縦断面, D: 茎頂部, E: 茎部, F: 葉部, 矢印: 再生部位 (Bars = 2.5 mm)



第19図 マイクロサージェリー1ヶ月後の  
 カルス再生個体横断切片におけるGUS発現  
 A,C,E: 旺盛な増殖を示すカルス,  
 B,D,F: ガラス化したカルス,  
 A,B: カルス表面,  
 C~F: 横断切片 (Bars = 2.5 mm)

## 総 合 考 察

カンキツ類における主な育種方法には、ウンシュウミカンに代表される「枝変わり」などを利用した突然変異育種法や‘清見’、‘津之香’および‘不知火’などを育成した交雑育種法があげられる(岩崎ら, 1966; 松本ら, 1991; 西浦ら, 1972; 1983). これらの育種法が現在栽培されているほとんどのカンキツ品種を育成したといっても過言ではない. この他, 特徴的な育種法として, 接ぎ木キメラを利用した育種法や細胞融合, 遺伝子組換えなどのバイオテクノロジーによる育種法などがある(Kobayashi ら, 1988; 1991; 1995; Ohgawara ら, 1985; 1989; Sugawara ら, 2002; Takami ら, 2004; 2005). さらに, 無核系統を効率的に育成する手法である三倍体育種に代表される倍数性育種があげられる(Recupero ら, 2005; Soost・Cameron, 1980; 1985; 徳永ら, 2005; 吉田ら, 2003). しかしながら, カンキツ類の育種を進める上での障害として, 多胚性(上野ら, 1967; 奥代ら, 1981), 雌雄性不稔性(Iwamasa, 1966; Nakano ら, 2001; 山本ら, 1992a; 1992b; Yamamoto ら, 1997; Yamamoto・Tominaga, 2002) および自家不和合性(Yamashita, 1978; 山下, 1980) などがあり, さらに, 果樹などの永年作物は, 雑種性が強く, 播種から開花結実に至るまで長年月を要するため, 有用形質に関する遺伝情報が乏しく, 計画的な育種の推進が困難である.

本研究でテーマとした「キメラ植物」の誘導や評価に関する研究はこれまでの品種の優秀性を維持したまま, 2つの遺伝子をうまく利用することにより, 互いの欠点を解消し, 新たな品種を可能にする. しかしながら, その誘導率は極めて低く, または熟練を要する. そこで, 本研究では, GUS 形質転換体と倍数体を組み合わせて, 細胞遺伝学及び組織発生的な解析を行い, 合成周縁キメラ化の原因や初期の発達ステージを明らかにし, マイクロサージェリーによる周縁キメラ植物体の効率的な作出について検討した. その結果, 試験管内で2つの組織をつなぎ合わせ, シュートの効率的な誘導法を開発し, GUS 形質転換体を利用して, その動向を探ることを可能にした. しかしながら, キメラと思われる個体を誘導することはできなかった. 今後, 外植体の調整方法, 植物ホルモンおよび外植体への圧力のかけ方等を改善し, さらに検討していく予定である.

# 研究発表

## 学術誌等

- 1) 安田 喜一、國武 久登、中川 匠子、黒木 宏憲、八幡 昌紀、平田 力也、吉倉 幸博、川上 郁夫、杉本 安寛：ニンポウキンカン‘勇紅’の倍数性周縁キメラの証明とその形態的特性、園芸学研究、7(2)：165-171 (2008)
- 2) Yahata, M., H. Kunitake, K. Yasuda, K. Yamashita, H. Komatsu, R. Matsumoto, Production of sexual hybrid progenies for clarifying the phylogenic relationship between *Citrus* and *Citropsis* species., *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 131(6): 764-769 (2006)
- 3) Yahata, M., H. Kunitake, T. Yabuya, K. Yamashita, Y. Kashiwara, H. Komatsu, Production of a doubled haploid from a haploid pummelo using colchicine treatment of axillary shoot buds. *J Amer Soc Hort Sci*, 130(6): 899-905 (2005)
- 4) Takami, K., A. Matsumaru, M. Yahata, H. Kunitake and H. Komatsu: Utilization of intergeneric somatic hybrids as an index discriminating taxa in the genus *Citrus* and its related species. *Sexual Plant Reproduction*, 18(1): 21-28 (2005)
- 5) 河瀬 憲次、八幡 昌紀、中川 匠子、原口 加奈、國武 久登：ニンポウキンカンにおける同質四倍体の選抜とその特性、園芸学研究、4(2)：141-146 (2005)
- 6) Yahata, M., H. Kurogi, H. Kunitake, K. Nagano, T. Yabuya, K. Yamashita and H. Komatsu: Evaluation of reproductive function in a haploid pummelo by crossing with several diploid citrus cultivars. *J Japan Soc Hort Sci*, 74(4): 281-287 (2005)