カンキツカルスの生長と胚発生に及ぼす γ -線の影響

仁藤伸昌・凌 経天・岩政正男・片山幸良

佐賀大学農学部 840 佐賀市本庄町一番地

Effects of γ -Irradiation on Growth and Embryogenesis of Citrus Callus

Nobumasa NITO, Jing-Tian LING, Masao IWAMASA and Yuki-yoshi KATAYAMA

Faculty of Agriculture, Saga University, Honjo, Saga 840

Summary

The embryogenic callus of 'Valencia' orange, 'Yoshida' navel orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), Calamondin (*C. madurensis* Lour.), Yuzu (*C. junos* Sieb. ex Tan.) and 'Ishizuka Wase' satsuma (*C. unshiu* Marc.) were exposed to 1, 5, 10, 20 and 50 kiloroentgen (kR) of gamma irradiation at the dosage of 1 kR/h in Institute of Radiation Breeding, Ministry of Agriculture, Forestry and Fishery, Japan.

The irradiation caused a retardation of callus growth. Callus growth was reduced to 50% or less of that in non-irradiated callus, at a dosage of 5 kR in Yuzu, 20 kR in 'Valencia' orange and 'Ishizuka Wase' satsuma, and 50 kR in 'Yoshida' navel orange and Calamondin.

The irradiation stimulated embryoid formation from the callus. Optimum irradiation dosages to produce the maximum number of embryoids were 50 kR in 'Valencia' orange, 20 kR in Yuzu, 10 kR in Calamondin and 'Ishizuka Wase' satsuma. 'Yoshida' navel orange produced the maximum number of embryoids at the lowest irradiation of 5 kR.

The ratios of embryoid number produced at the optimum irradiation to that at non-irradiation were, 16.4, 8.4, 7.8, 6.4 and 2.7 in Yuzu, 'Ishizuka Wase' satsuma, 'Valencia' orange, 'Yoshida' navel orange and Calamondin, respectively.

緒 言

永年生の果樹では自然突然変異の多くはいわゆる枝変わりとして品種改良に利用されてきたが、特にカンキツではその利用はめざましく進んでいる(10)。スイートオレンジ、ウンシュウミカン、グレープフルーツ、レモンなどの主要な種類は偶発実生として発生したものであるが、栽培が広がるにつれて自然突然変異が選抜集積され、いずれも多数の突然変異系からなる栄養系品種群となった。したがって、これらの種類の栽培品種はすべて突然変異系といってよく、この変異系から新たな突然変異が発生している。他の種類においても栽培の広がりとともに突然変異が発見され優良系統が選抜されている。

このように突然変異の利用が進んでいるカンキツにおいてもその発生率は高いとはいえず、自然突然変異の発見は容易ではない。そこで、人為的に突然変異を誘起す

るために、種子(5, 7, 21)や植物体(4, 6, 17, 18, 21)に対する放射線照射が試みられてきた。その中にいくつかの成功例を見ることができる。すなわち、Hensz(7)はグレープフルーツの鮮紅色で有核の品種、'Hudson'の珠心胚実生に熱中性子を照射し、無核の品種'Star Ruby'を育成した。また、Hearnはいずれも有核品種である'Pineapple'オレンジと'Duncan'グレープフルーツの種子(5)及び'Foster'グレープフルーツの植物体の芽(6)に γ -線を照射し、少核や無核の変異系を育成している。

種子や植物体の芽を放射線で照射する場合、そのmeristemは多数の細胞から構成されているので、突然変異はその細胞のどれかひとつに生起することになる。そうするとこのmeristemから伸長する枝は突然変異細胞に由来する変異組織と、変異しないもとの細胞からの組織とが共存する、いわゆるキメラになる可能性が強い。自然界にもこのようなキメラが報告されているが(2, 10)、突然変異を利用するためには、キメラではなく純粋な突

1988年7月18日 受理

この研究の一部は昭和62年度文部省経費による放射線育種場共同利用研究によって行われたものである。

然変異個体であることが望ましい。

試験管内で培養しているカルスに放射線照射を行い、その単細胞から植物体を再生できれば、純粋な突然変異個体が得られるはずである。また、このようなカルスをを用いた実験では、1回の照射により多数の変異個体を育成できて、極めて効率的である。著者らは、カンキツの多数の品種から胚発生能をもつカルスを誘導しており、このカルス由来のプロトプラストから植物体を育成することに成功している(11, 12, 14, 15)。

本研究では、このようなカルスの放射線照射によって生じる突然変異細胞から純粋な変異個体を育成し、それを品種改良に利用するために、 γ -線照射がそれらのカルスの生長及び胚発生に及ぼす影響について調査した。

材料及び方法

著者らが保存しているスイートオレンジ (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) の‘バレンシア’と‘吉田’ネーブル、シキキツ (*C. madurensis* Lour.), ユズ (*C. junos* Sieb. ex Tan.) 及びウンシュウミカン (*C. unshiu* Marc.) の‘石塚早生’の胚発生能を有するカルスを材料とした。‘バレンシア’オレンジ, ‘吉田’ネーブルオレンジ及びユズのカルスは幼果の胚珠から誘導した珠心カルスである。シキキツのカルスはやく培養により分化した植物体(13, 14)の胚軸部から生じたカルスで、染色体数は $2n=18$ である。それらのカルスをベンジルアデニン 10 ppm, ショ糖 5% 及び寒天 1% 添加の Murashige and Tucker (MT)(16) 培地で1か月間隔に継代培養した。‘石塚早生’のカルスは成熟果の未発達胚珠を培養して得た胚様体から誘導したものであり、アデニン 25 ppm, ジベレリン 1 ppm, 麦芽抽出物 400 ppm, ショ糖 5% 及び 0.2% ゲルライト添加の MT 培地で1か月間隔に継代培養した(15)。このカルスは植物ホルモン類及び麦芽抽出物を添加しない培地へ移植すると胚発生し、さらに培養すると独立した植物体になることが確かめられている。

上記のカルスを試験管(200×150 mm)の新鮮培地に移植し、培養3週間後にそれぞれの品種につき5本ずつの試験管を農林水産省農業生物資源研究所放射線育種場に搬入し、 ^{60}Co を線源とする γ -線照射を行った。照射線量は1 kR/h で、総線量を1, 5, 10, 20 及び50 kR とし、試験管を通してカルスに照射した。

γ -線照射がカルスの生長に及ぼす影響を調査するために、1試験管から約50 mg のカルス片を2個ずつ切り取り、1品種当たり計10個を継代培養の培地10本に移植し、4週間後にカルスの新鮮重を測定した。また胚発生に及ぼす照射の影響をみるために、前述の生長の測定と

同じ要領で1品種当たり10個のカルス片を胚発生用の植物ホルモン無添加のMT培地に移植し、4週間後に発生した緑色の胚様体の数を調査した。培養は、25°C, 3,000 lx, 16時間日長下で行った。

結 果

照射によるカルスの外観上の変化は見られなかった。

カルスの生長は照射により抑制され、照射線量が高くなる程強く抑制された(第1表)。 γ -線に対する感受性は品種によって異なり、1 kR 照射の場合の無照射に対する相対生長率はユズで低く59.0%であったが、その他の品種では90%以上であった。生長抑制が顕著に現われたのは20 kR 以上の場合で、抑制の度合いが最も低かったシキキツでも生長量は無照射の約2/3に減少した。生長量が無照射の50%以下になる線量は、ユズで5 kR, ‘バレンシア’オレンジと‘石塚早生’で20 kR, ‘吉田’ネーブルオレンジとシキキツで50 kR あった。50 kR の照射では、‘バレンシア’オレンジとユズのカルスの生長が著しく抑制され、無照射に対してそれぞれ7.7%と8.6%であった。しかしその他の品種は無照射の30%前後であった。なお、照射線量の増加につれて抑制の程度が増大したものの、最大照射量の50 kR でもカルス全部が死ぬことはなかった。

このように品種により照射線量に対する感受性の差が見られたが、いずれの場合も照射により生長は抑制された。ところが胚様体形成は γ -線照射によってむしろ促進された(第2表)。胚様体形成が最も促進された線量は品種によって異なり、‘バレンシア’オレンジでは50 kR, ‘吉田’ネーブルオレンジでは5 kR, シキキツと‘石塚早生’では10 kR, そしてユズでは20 kR であった。照射の促進的な影響を最も強く受けた品種はユズで、20 kR の照射で無照射の16.4倍の胚様体が形成された。シキキツでは胚様体形成数は多かったが、照射による促進の度合いは低く、10 kR で無照射の2.7倍であった。

‘バレンシア’オレンジの胚様体形成数は照射線量の増加にともなって増え、50 kR では無照射の7.8倍になった。ユズは20 kR で最も促進され、無照射の16.4倍になったが、50 kR では1.8倍であった。‘吉田’ネーブルオレンジ、シキキツ及び‘石塚早生’でも最も促進された線量を越えると胚様体形成は抑制された。

考 察

突然変異誘発のために培養細胞やプロトプラストに放射線照射した例はいくつか報告されている(1, 3, 8)。しかし、供試材料、培養条件、照射線源などの種類により、照射処理に対する培養細胞及びプロトプラストの反応は異なり、一定の傾向はみられていない。

Table 1. Effect of gamma irradiation on callus growth in citrus cultivars.

Cultivar	Radiation dose (kR)	Initial callus weight (mg) ^{a)}	Yield of callus (mg) ^{b)}	Ratio of b/a	Relative callus growth
'Valencia' orange	0	69	1766±172	24.6	100.0
	1	56	1388±245	23.8	96.7
	5	69	1722±270	23.9	97.2
	10	49	1009±232	19.6	79.7
	20	92	898±262	8.7	35.4
	50	85	249±159	1.9	7.7
'Yoshida' navel orange	0	54	1999±147	36.0	100.0
	1	54	1884±133	33.9	94.2
	5	47	1588±145	32.8	91.1
	10	55	1791±259	31.6	87.8
	20	71	1628±252	21.9	60.8
	50	62	877±280	13.1	36.4
Calamondin	0	58	2574±87	43.4	100.0
	1	57	2442±297	41.8	96.3
	5	63	2221±183	34.3	79.0
	10	66	2131±201	31.3	72.1
	20	53	1561±112	28.5	65.7
	50	43	517±212	11.0	25.3
Yuzu	0	33	919±141	26.8	100.0
	1	55	926±75	15.8	59.0
	5	52	686±110	12.2	45.5
	10	55	688±99	11.5	42.9
	20	50	339±59	5.8	21.6
	50	43	144±35	2.3	8.6
'Ishizuka Wase' satsuma	0	38	518±84	12.6	100.0
	1	56	747±133	12.3	97.6
	5	56	647±161	10.6	84.1
	10	66	598±82	8.1	64.3
	20	52	386±78	6.4	50.0
	50	33	144±66	3.4	26.9

Table 2. Effect of gamma irradiation on embryogenesis of citrus callus (Mean±S.E.)

Cultivar	No. of embryoid					
	0 kR	1 kR	5 kR	10 kR	20 kR	50 kR
'Valencia' orange	1.8±0.9	1.8±1.3	3.0±1.0	3.8±0.8	6.6±1.4	14.0±2.8
'Yoshida' navel orange	3.4±2.4	12.8±2.5	21.8±3.8	14.0±2.3	8.6±1.3	1.8±1.3
Calamondin	104.0±7.5	177.0±10.3	125.8±23.5	276.0±28.2	137.2±6.0	48.2±10.6
Yuzu	3.6±2.0	5.4±2.1	9.6±2.5	17.6±3.3	59.0±8.3	6.4±0.5
'Ishizuka Wase' satsuma	3.8±1.3	12.0±1.6	5.8±2.0	32.0±2.5	14.6±1.8	3.8±1.3

カンキツでは Spiegel-Roy と Kochba(19) が胚発生能を有する 'Shamouti' オレンジの珠心由来のカルスに 0.5 kR から 32 kR までの γ -線照射を行っている。その結果カルス生長は 0.5 kR から 8 kR で、胚発生は 4 kR から 20 kR で促進され、28 kR から 32 kR の照射は致死的事であることを示した。本実験においては彼らの場合と多少異なり、カルスの生長は照射線量の増加にともない抑制の傾向を示し、胚発生は、品種によって最適線量は異なったが、5 kR から 50 kR の幅広い範囲で

促進された。

本実験で用いた 5 品種はすべて照射線量の増加にともないカルスの生長は抑制された。特にユズでは照射による生長抑制が顕著にみられ、5 kR の照射で相対生長率は 45.5% に減少した。

品種により有効な線量は異なったが、照射は明らかに胚発生を促進した。Spiegel-Roy と Kochba(19) は γ -線照射による胚発生の促進をカルスに対する直接の影響と、照射による培地中の物質の変化によるものとに分け

て考察している。本実験では照射後、カルスを新しい培地に移植し、培養した後に胚発生の状態を調査したので、胚発生の促進は培地の物質の変化によるものではなく、照射の直接的な影響によるものと考えられる。供試したカルスは植物ホルモンを添加した培地ではカルスとして増殖し、ホルモン無添加の培地では胚に分化する性質をもっている。このことから、 γ -線照射によるカルス中のホルモンレベルの変化が胚発生に促進的に作用したと推察される。

多胚性カンキツ品種の花らいに γ -線照射を行うと種子中の胚数が減少することから、 γ -線照射は珠心胚形成を抑制するとみなされている(9, 20, 22)。本報で供試した胚発生能をもつカルスは多胚性品種の珠心細胞に類する性質をもつものと思われるが、 γ -線照射に対しては異なった行動を示しており、生体内での珠心胚形成とカルスからの胚発生を比較検討するひとつの手がかりになるものと思われる。

Spiegel-Roy と Kochba(19) が致死線量とみなした 30 kR の前後の 28 kR と 32 kR では、カルスの相対生長率は、それぞれ 21.1% と 16.6% であった。彼らが示した約 20% の生長率を致死の基準と考えると、本実験ではユズが 20 kR, ‘バレンシア’ オレンジが 50 kR で、他の品種では 50 kR でも致死線量に達していない。本実験で高い総線量でもカルスが生存したのは、品種の違いもあるが、その他の理由として、Spiegel-Roy と Kochba(19) の場合とは照射処理方法の相違が考えられる。すなわち彼らの処理は 1 時間当たり 3.1 kR を照射しており、本実験での 1 時間当たり 1 kR と比べて時間当たり 3.1 倍の線量を照射している。

カルスは高いレベルの照射線量でも生存が可能なようである。グレープフルーツ(6), クレメンティンマンダリン及びオレンジ(17) の芽への照射では致死線量は 8 kR から 10 kR であることが確かめられている。種子に対する致死線量は ‘Pineapple’ オレンジと ‘Duncan’ グレープフルーツで 25 kR, ‘Foster’ グレープフルーツで 15 kR と報告されている(5)。放射線感受性は水分含量が多い材料ほど高いといわれている(5)。本実験で用いたカルスの水分含量は 85% 以上であったにもかかわらず感受性は低かった。カルスの放射線感受性が種子や芽、枝などの生体組織より低い理由として、カルスには分裂可能な細胞が多いこと、生体中では死滅するはずの突然変異細胞が培地条件下で十分な栄養を吸収できるため生き残り易いことなどが考えられる。

本実験ではカルスへの照射はガラス製試験管を通して行った。 γ -線がガラスを通過する際の減衰も考慮しなけ

ればならないであろう。

胚形成を経て得られた植物体は、変異を調査するために現在育成中である。

摘 要

‘バレンシア’ オレンジ, ‘吉田’ ネーブルオレンジ, シキキツ, ユズおよび ‘石塚早生’ ウンシュウの胚発生能を有するカルスに 1 kR/h の線量で 1, 5, 10, 20 及び 50 kR の γ -線照射を行い、その後のカルスの生長と植物体再生に及ぼす影響を調査した。

カルスの生長は γ -線照射により抑制され、生長が無照射の 50% 以下になったのはユズで 5 kR, ‘バレンシア’ オレンジと ‘石塚早生’ で 20 kR, ‘吉田’ ネーブルオレンジとシキキツで 50 kR であった。

カルスからの胚様体形成は γ -線照射によって促進された。最大の促進が見られた線量とその際の無照射のカルスに対する形成された胚数の比率は、それぞれ ‘バレンシア’ オレンジでは 50 kR と 7.8 倍, ユズでは 20 kR と 16.4 倍, シキキツでは 10 kR と 2.7 倍, ‘石塚早生’ では 10 kR と 8.4 倍及び ‘吉田’ ネーブルオレンジでは 5 kR と 6.4 倍であった。

謝 辞 カルスの γ -線照射に際し農林水産省農業生物資源研究所放射線育種場矢頭 治氏にご協力いただいた。記して感謝の意を表します。

引用文献

1. BLONSTEIN, A. D. and P. J. KING. 1985. Plant mutant isolation via protoplast. p. 151-168. In: L. C. Fowke and F. Constabel (eds.), Plant protoplasts. CRC Press, Inc., Florida.
2. CAMERON, J. W., R. K. SOOST, and E. O. OLSON. 1964. Chimeral basis for color in pink and red grapefruit. J. Herd. 55: 23-28.
3. EVANS, D. A. and E. F. PADDOCK. 1977. Mitotic crossing-over in higher plants. p. 315-351. In: W. R. Sharp, P. O. Larsen, E. F. Paddock, and V. Raghavan (eds.) Plant cell and tissue culture, principles and applications. Ohio State Univ. Press, Columbus.
4. GREGORY, W. C. and M. P. GREGORY. 1965. Induced mutations in quantitative characters: Experimental basis for mutations to hardness in *Citrus*. Proc. Soil & Crop Sci. Fla. 25: 372-376.
5. HEARN, C. J. 1984. Development of seedless orange and grapefruit cultivars through seed irradiation. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 109: 270-273.
6. HEARN, C. J. 1986. Development of seedless grapefruit cultivars through budwood irradiation. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 111: 304-306.
7. HENSZ, R. A. 1971. Star Ruby, a new deep-

- red-fleshed grapefruit variety with distinct tree characteristics. J. Rio Grande Hort. Sci. 25: 54-58.
8. HOWLAND, G. P. and R. W. HART. 1977. Radiation Biology of cultured plant cells. p. 731-756. In: J. Reinert and Y. P. S. Bajaj (eds.) Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture. Springer-Verlag, New York.
 9. IKEDA, F. 1981. Repression of polyembryony by gamma-rays in polyembryonic *Citrus*. Proc. Int. Soc. Citriculture 1: 39-44.
 10. IWAMASA, M. 1983. Role of mutation in fruit breeding. Gamma-Field Symp. 22: 31-48.
 11. 國武久登・凌 経天・仁藤伸昌・岩政正男. 1986. カンキツのプロトプラストからの効率的な植物体再生について. 園学要旨. 昭61秋. 16-17.
 12. 國武久登・凌 経天・仁藤伸昌・岩政正男. 1988. ウンシュウミカンプロトプラストからの植物体再生. 園学要旨. 昭63春. 56-57.
 13. LING, J. T., M. IWAMASA and N. NITO. 1988. Plantlet regeneration by anther culture of Calamondin (*Citrus madurensis* Lour.). Proc. 6th Intl. Citrus Cong. 59-64.
 14. 凌 経天・國武久登・仁藤伸昌・岩政正男. 1986. シキキツの胚軸由来カルスからの胚発生およびプロトプラストの単離・培養. 園学要旨. 昭61秋. 12-13.
 15. 凌 経天・國武久登・仁藤伸昌・岩政正男. 1988. ウンシュウミカンの embryogenic callus の誘導と維持. 園学要旨. 昭63春. 54-55.
 16. MURASHIGE, T. and D. P. TUCKER. 1969. Growth factor requirements of citrus tissue culture. Proc. Int. Citrus Symp. 3: 1155-1161.
 17. RUSSO, F., B. DONINI, and S. STARRATINO. 1981. Mutagenesis applied for citrus improvement. Proc. Int. Soc. Citriculture 1: 68-70.
 18. SPIEGEL-ROY, P. and J. KOCHBA. 1973. Mutation breeding in citrus. p. 91-103. In: Induced mutation in vegetatively propagated plants. ITEA, Vienna.
 19. SPIEGEL-ROY, P. and J. KOCHBA. 1973. Stimulation of differentiation in orange (*Citrus sinensis*) ovular callus in relation to irradiation of the media. Rad. Bot. 13: 97-103.
 20. SPIEGEL-ROY, P., A. H. TEICH, and J. KOCHBA. 1972. Gamma irradiation and pollen cultivar influence on polyembryony of satsuma (*C. unshiu* Marc.). Rad. Bot. 12: 365-367.
 21. SPIEGEL-ROY, P. and R. PADOVA. 1973. Radiosensitivity of Shamouti orange (*Citrus sinensis*) seeds and buds. Rad. Bot. 13: 105-110.
 22. WATANABE, H. 1985. Artificial control of polyembryogenesis in *Fortunella* by continuous gamma irradiation. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 110: 418-421.