

## コルヒチンの減圧吸収法によるカンキツ4倍体作出の効率化

政本泰幸・喜多景治・兵頭洋仁・高木信雄

### **Efficiency of citrus tetraploidy production by the colchicine decompression absorption method.**

Yasuyuki Masamoto , Keiji Kita, Youji Hyoudou and Nobuo Takagi

#### **Summary**

In the past, tetraploidy has been induced by dipping axillary buds in colchicine. However, at high concentrations this results in a high death rate, while low concentrations result in a low production rate. Here we report a method intended to improve the efficiency of tetraploidy induction by decompressing bearing shoots during colchicine absorption. Both top-grafting shoots and intact bearing shoots on nursery stock were tested.

1 ) Of 272 bearing shoots treated with colchicine using the decompression absorption method, 255 produced new buds and 17 died. The probability of polyploidy occurrence was 6.6% for tetraploidy and 18.4% for chimera. Compared to the standard method these rates are 7.3 times higher for tetraploidy and 16.7 times higher for chimera. Moreover, the death rate for the decompression absorption method was 6.2%, which is markedly lower than the rate of 43.6% with the standard method.

2 ) For the top grafting shoots, the 'Moro' and 'KIP' varieties each yielded one example of tetraploidy, and 'Natsumi', 'Tarocco', 'Kawachibankan', 'Chandler-pomelo', 'Shiikuwasha' and two other varieties yielded a total of 12 examples of chimera.

3 ) For the intact bearing shoots a total of 20 examples of tetraploidy were produced by 'Kawachibankan', 'Shiikuwasha' and three other varieties. A total of 37 examples of chimera were produced by 'Wilking', 'Person Brown', 'KIP', 'sweet Lyme' and another nine varieties. The variety with the highest rate of polyploidy incidence was 'Shiikuwasha', with 16.0% for tetraploidy and 18.7% for chimera.

4 ) The most productive decompression absorption process was 2 treatments, each of 15 minutes, of 0.1% colchicine. This gave a tetraploidy rate of 14.7%.

**Key Words** : polyploid breeding, flow cytometry, tetraploidy, colchicine, decompression absorption

## 緒 言

カンキツの新品種育成において、無核品種を育成することは重要な目標の一つである。

無核品種育成の一手法として3倍体育成がある。現在までに育成された3倍体品種としてアメリカで育成された‘オロブランコ’ (Soost・Cameron, 1980)や‘メロゴールド’ (Soost・Cameron, 1985)、イタリアの柑橘類研究所で育成された‘タクレ’や‘マンダレッド’ (Recupero, 2005)、国内で育成されたキンカン‘ぶちまる’ (吉田ら, 2003)、スタチ‘徳島 3X1 号’ (徳永ら, 2005)、熊本県が育成したブンタンの‘さきつ’ (‘晩白柚’に‘チャンドラーポメロ’を交配して得られた小粒種子から育成) などがある。‘さきつ’を除いてほとんどの3倍体は交配親として4倍体が利用されており、3倍体品種の育成には4倍体品種は必要不可欠である。3倍体は単胚性の2倍体品種を種子親、4倍体品種を花粉親として交配すると、効率的に3倍体が育成できるという多くの報告 (Cameron・Soost 1969; Esenら, 1978; 八幡ら, 2003) があり、広島県が積極的に行っている (金好ら, 2008)。多胚性品種を種子親に用いた場合でも、みかん研究所に導入されたフローサイトメトリーを使用することにより、早期に珠心胚実生を取り除き、3倍体交雑実生を選抜することができる。

従来4倍体は生山による腋芽のコルヒチン浸漬処理 (1992) により作出していたが、高濃度では枯死が多く、低濃度では作出率が低かった。また組織が小さいために、育種親に用いるまでに年月がかかっていた。そのため、本報では早期に育種親として用いることのできる4倍体を作成するために、高接ぎ可能な結果母枝や苗木を供試するとともに、コルヒチンの処理法についても検討して、4倍体作出の効率化を図った。

## 材料及び方法

結実樹齢に達した‘モロ’他7品種の2年枝および‘ウィルキング’等の既存にある8品種および交配育成中の13品種の2~4年生苗木のインタクトな状態の結果母枝を供試した。なお、交配実生はコルヒチン処理前に2倍体であることを確認した個体を用いた。減圧吸収は2年枝 (穂木) および苗木の結果母枝をシリコンチューブとメダールで密閉してそのチューブ内にコルヒチンを満たした。その穂木および苗木を真空デシケーター内に入れて直結型油回転真空ポンプを利用して、 $-0.08 \sim -0.1 \text{MPa}$  の減圧条件下でコルヒチンを吸収させた。苗木はポットごと入る特注真空デシケーター (W370×D370×H770mm) (写真1) を用いて、真空状態とした。コルヒチンの濃度は0.01%、0.03%、0.05%、0.1%の4処理、処理時間は10分、15分、20分、30分、15分×2回、10分×3回吸収の6処理とした。2年枝は5~8年生の温州みかんを中間台として腹接ぎした。対照区は‘タロッコ’の幼梢と腋芽を供試して0.1%のコルヒチンに120分間浸漬後ただちに茎頂接木した。倍数性はPARTEC社製のプロイディーアナライザーPA (フローサイトメトリー) で検定した。

## 試験結果

(1) コルヒチン処理法が倍数体発生率に及ぼす影響

272本の結果母枝にコルヒチンを減圧吸収させると処理後に255本の新梢が発生して、17本が枯死した。発生した新梢のうち2倍体は187本、4倍体と2倍体のキメラが50本、4倍体が18本であった。一方、従来の浸漬と茎頂接木の併用法では330個体のうち186個体が新梢が発生して、144個体が枯死した。

4倍体の発生確率は減圧吸収法で6.6%、従来の浸漬と茎頂接木法 (以下、従来法とする。) で0.9%であった。キメラの発生確率は減圧吸

収法で 18.4%、従来法で 1.2%であった。減圧吸収法の倍数体発生確率は従来法よりも 4 倍体で 7.3 倍、キメラで 16.7 倍高かった。

また従来法では枯死率が 43.6%と高かったが、減圧吸収法では 6.2%と顕著に低かった(表1)。

(2) 穂木におけるコルヒチン減圧吸収が倍数体発生率に及ぼす影響

コルヒチンを減圧吸収させた穂木から、'モロ'(写真2)と'KIP'の4倍体それぞれ1個体ずつ、および'南津海'、'タロッコ'、'河内晩柑'、'チャンドラポメロ'、'シークワシャー'他2品種のキメラを合わせて12個体得られた(表2)。4倍体の'モロ'はコルヒチン0.1%の15分処理、4倍体の'KIP'はコルヒチン0.1%の30分処理により作出された。

(3) 苗木のインタクトな状態の母枝におけるコルヒチン減圧吸収が倍数体発生に及ぼす影響(写真3)

コルヒチンを減圧吸収させた苗木のインタクトな母枝から、4倍体'はれひめ×薩州ポンカン'を2個体、4倍体'清見×フォーチュン'を1個体、4倍体'河内晩柑'を1個体、4倍体'日向夏×サザンイエロー'を3個体、4倍体'日向夏×じゃばら'を1個体、4倍

体'シークワシャー'を12個体および'ウィルキング'、'パーソンブラウン'、'清見×じゃばら'、'KIP'、'日向夏×デコポン'、'スイートライム'、'レモン×三宝柑'、'レモン×じゃばら'他5品種のキメラを37個体得られた。4倍体'はれひめ×薩州ポンカン'、4倍体'KIP'はコルヒチン0.1%の30分処理、4倍体'清見×フォーチュン'、4倍体'日向夏×サザンイエロー'、4倍体'日向夏×じゃばら'はコルヒチン0.1%の15分×2回処理、4倍体'河内晩柑'はコルヒチン0.1%の20分処理により作出された。'シークワシャー'は4倍体になりやすく、12個体作出された。4倍体'シークワシャー'はコルヒチン0.1%の20分処理、0.05%の30分処理でそれぞれ2個体ずつ、0.1%の30分処理、0.05%の20分処理でそれぞれ4個体ずつ作出された(表3、4)。

(4) 減圧吸収法におけるコルヒチン濃度と処理時間が倍数体発生率に及ぼす影響

減圧吸収法において、4倍体発生率が最も高かったのは0.1%コルヒチンの15分×2回処理であり、その発生率は14.7%であった。10分×3回処理した個体からは新梢が発生しなかった(表5)。

表1 コルヒチン処理法が倍数体発生率に及ぼす影響

処理法	処理数	枯死数 (枯死率)	生存数 (生存率)	倍数体数 (倍数体率)		
				2X	キメラ(2X+4X)	4X
減圧吸収	272	17 (6.2)	255 (93.8)	187 (68.8)	50 (18.4)	18 (6.6)
浸漬+茎頂接木	330	144 (43.6)	186 (56.4)	179 (54.3)	4 (1.2)	3 (0.9)

\*はれひめ, タロッコ, シークワシャー等を供試.

表2 穂木におけるコルヒチン減圧吸収が倍数体発生に及ぼす影響

系統	品種	コルヒチン濃度 (%)	処理時間 (分)	処理本数	2X	キメラ 2X+4X	4X
マンダリン	南津海	0.1	30	1		1	
オレンジ	タロッコ	0.1	30	9	6	3	
	モロ	0.1	15	7	5	1	1
	サンギネ	0.1	15	1	1		
タゴール	KIP(清見×今津ポンカン)	0.1	30	14	11	2	1
ブンタン類	河内	0.05	30	3	2	1	
	チャンドラポメロ	0.1	15	4	3	1	
香酸カンキツ	シークワシャー	0.05	30	20	17	3	



写真1 特注真空デシケータ

写真2 4倍体‘モロ’

写真3 減圧吸収の状態

表3 ポット苗木(マンダリン、オレンジ、タンゴール)におけるコルヒチン減圧吸収法が倍数体作出に及ぼす影響

系統	品種	コルヒチン濃度 (%)	処理時間 (分)	処理本数	無発生	倍数体		
						2X	キメラ 2X+4X	4X
マンダリン	ウルクィング	0.1	10	3		2	1	
	はれひめ×薩州ボンカン	0.1	20	4	1	3		
	はれひめ×薩州ボンカン	0.1	30	6		2	2	2
	はれひめ×薩州ボンカン	0.1	15×2	1			1	
	まりひめ×サンギネ	0.1	30	3	1	2		
	まりひめ×サンギネ	0.1	15×2	1		1		
	太田ボンカン	0.1	20	1		1		
	太田ボンカン	0.1	30	1	1			
オレンジ	ハートソブラウン	0.05	10	1			1	
	タッコ	0.1	20	3		3		
	タッコ	0.05	30	1		1		
タンゴール	清見×じゃばら	0.1	30	5		2	4	
	清見×フォーチュン	0.1	30	1	1			
	清見×フォーチュン	0.1	15×2	11		9	1	1
	清見×フォーチュン	0.1	10×3	1	1			
	清見×エレンディル	0.1	30	1	1			
	清見×ザンイロ-	0.1	30	1	1			
	清見×ザンイロ-	0.1	10×3	1	1			
	KIP(清見×今津ボンカン)	0.1	30	3		2	1	

表4 ホット苗木(ブンタン類、香酸カキツ)におけるコルチゾン減圧吸収法が倍数体作出に及ぼす影響

系統	品種	コルチゾン濃度 (%)	処理時間 (分)	処理本数	無発生	倍数体		
						2X	キメラ 2X+4X	4X
ブンタン類	河内晩柑	0.1	20	7		4	2	1
	河内晩柑	0.1	30	4	1	1	2	
	河内×じゃばら	0.1	30	4		4		
	河内×じゃばら	0.1	15×2	1	1			
	日向夏×テコボソ	0.1	30	4		3	1	
	日向夏×サザンハイロ-	0.1	30	5		4	1	
	日向夏×サザンハイロ-	0.1	15×2	9		3	3	3
	日向夏×サザンハイロ-	0.1	10×3	1	1			
	日向夏×モロ	0.1	30	3		3		
	日向夏×モロ	0.1	10×3	1	1			
	日向夏×じゃばら	0.1	15×2	2		1		1
香酸カキツ	シークワシャー	0.1	20	10		6	2	2
	シークワシャー	0.1	30	20		9	7	4
	シークワシャー	0.05	20	12		8		4
	シークワシャー	0.05	30	13		9	2	2
	スイートライム	0.05	30	2		1	1	
	レモン×三宝柑	0.1	30	3	1	2		
	レモン×三宝柑	0.1	15×2	4		3	1	
	レモン×じゃばら	0.1	30	4		3	1	
	レモン×じゃばら	0.1	15×2	5		2	3	

表5 減圧吸収法におけるコルチゾン濃度と処理時間が倍数体発生率に及ぼす影響

コルチゾン濃度 (%)	処理時間 (分)	処理本数	無発生	2X	キメラ		4X	4X発生率 (%)
					2X+4X	2X+4X+8X		
0.1	10	4		2	1	1		0.0
0.1	15	22		19	2		1	4.5
0.1	20	15	1	11	2		1	6.7
0.1	30	79	7	51	18		3	3.8
0.1	15×2	34	1	19	9		5	14.7
0.1	10×3	4	4					0.0
0.05	30	46		42	4			0.0
0.03	30	2		1	1			0.0
0.01	30	5		5				0.0

\*倍数体作出率の高かったシークワシャーを除く。

## 考 察

減圧吸収法は従来法の腋芽よりも大きな結果母枝を用いたために、枯死率は従来法の56.4%に対して6.2%と顕著に減少した。

Sanford (1983) は、果樹類での倍数体作出について、コルヒチン処理を行う組織が大きいほどキメラになりやすいことを指摘しているが、本試験においても組織が大きかった減圧吸収法でキメラの発生率が高かった。

品種では‘シークワシャー’の倍数体発生率が高く、その発生確率は4倍体で16.0%、キメラで18.7%であった。減圧吸収法において、4倍体発生率が最も高かったのは0.1%コルヒチンの15分×2回処理であり、その発生率は14.7%であった。10分×3回処理した個体からは新梢が発生しなかった。このことから減圧吸収は2回までの連続使用までが良いと思われる。

減圧吸収法は穂木または植物体そのままの母枝を用いるため、枯死が少なく従来よりも低濃度のコルヒチンでかつ短時間の処理で4倍体を得られる可能性が認められた。Frostは4倍体実生樹の特徴として、生育が遅く、旺盛に伸びる枝が少ないため、樹全体がコンパクトである等を明らかにしている。今回育成された4倍体についても同様に生育が緩慢であり、すぐに育種親に用いることができるほどの十分な生育が得られていない。そのため、今後作出した4倍体を早期に育成する研究等を続ける必要がある。

## 摘 要

従来4倍体は腋芽のコルヒチン浸漬により作出していたが、高濃度では枯死が多く、低濃度では作出率が低かった。本報告では高接ぎ可能な結果母枝や苗木のインタクトな結果母枝にコルヒチンを減圧吸収させることによって4倍体作出の効率化を図った。

(1) コルヒチンの減圧吸収処理した結果母

枝272本から255本の新梢が発生して、17本が枯死した。減圧吸収法による倍数体発生確率は4倍体で6.6%、キメラで18.4%となり、従来法よりも4倍体で7.3倍、キメラで16.7倍高かった。

また減圧吸収法の枯死率は6.2%で、従来法の43.6%と比べて顕著に低かった。

(2) コルヒチンを減圧吸収させた穂木から、‘モロ’と‘KIP’の4倍体それぞれ1個体ずつ、および‘南津海’‘タロッコ’‘河内晩柑’‘チャンドラポメロ’‘シークワシャー’他2品種のキメラを合わせて12個体得られた。

(3) 苗木のインタクトな母枝から、‘河内晩柑’と‘シークワシャー’他3品種の4倍体を20個体、および‘ウィルキング’‘パーソンブラウン’‘KIP’‘スイートライム’他9品種のキメラを37個体得られた。品種では‘シークワシャー’の倍数体発生率が高く、その発生確率は4倍体で16.0%、キメラで18.7%であった。

(4) 減圧吸収法において、4倍体発生率が最も高かった処理法は0.1%コルヒチンの15分×2回処理であり、その発生率は14.7%であった。

## 引用文献

Cameron, J.W. and R.K. Soost. 1969.

Charters of new population of citrus polyploids and the relation between tetraploidy in the pollen parent and hybrid tetraploid progeny. Proc. 1<sup>st</sup>. Int. Citrus Symp. 1:199-205.

Esen, A., R.K. Soost and G. Geraci. 1978. Seed set, size and development after 4X × 2X crosses in citrus. Euphytica 27:284 - 294.

Frost, H. B. (1948). Genetics and breeding. The Citrus Industry Vol. I. H.. J. Webber and L. D. Bachelor, Eds. Univ. Calif. Press, Berkeley and Los Angeles. 817 -

914.

G. Reforgiato Recupero, G. Russo, and S. Recupero. (2005) New Promising Citrus Triploid Hybrids Selected from Crosses between Monoembryonic Diploid Female and Tetraploid Male Parents. HortScience 40(3):516 - 520.

Sanford, J. C. 1983. Ploidy manipulations. p.100 - 123 . In J. N. Moore and J. Janick, (eds.). Methods in fruit breeding. Purdue University Press, Indiana.

Soost, R. K. and J. W. Cameron. 1980. 'Oroblanco', a triploid pommelo-grapefruit hybrid. HortScience 15: 667-669.

Soost, R. K. and J. W. Cameron. 1985. 'Melogold', a triploid pommelo-grapefruit hybrid. HortScience 20: 1134-1135.

生山巖 . 1992 . カンキツ類の倍数性育種に関する研究 - 主として四倍性育種素材の作出について - . 果樹試報 . 特報 3 : 20 - 26 , 41 - 52 .

金好純子・古田貴音・蔵尾公紀・山口 聡 . 2008. 単胚性カンキツにおけるコルヒチン処理による四倍体の作出とその種子親としての利用による三倍体の獲得 . 園学研 . 7(1) : 5 - 10 .

徳永忠士・新居美香・津村哲宏・山尾正美 . 2005. スダチにおける四倍体と二倍体との交雑による三倍体雑種の作出および無核品種 '徳島 3X1号' の育成 . 園学研 . 4 : 11-15 .

八幡昌紀・岡 信孝・國武久登・山口清二・小松春喜 . 2003. '晩白柚' と四倍体の正逆交雑から得られた種子の重さと倍数性との関係 . 園学研 . 2 : 247 - 252 .

吉田俊雄・根角博久・吉岡照高・家城洋之・伊藤祐司・中野睦子・上野勇・山田彬雄・村瀬昭治・瀧下文孝 . 2003 . キンカン新品種 'ぶちまる' . 果樹研報 . 2 : 9 - 16 .