

和歌山農林水技セ研報 2 : 41~48, 2001

胚培養によるカキ ‘刀根早生’ と ‘西村早生’ の交雑個体の作出

岩本 和也

農林水産総合技術センター 暖地園芸センター

Production of Japanese Persimmon ‘Tonewase’ and ‘Nishimurawase’
Hybrids by Embryo Culture

Kazuya Iwamoto

*Horticultural Experiment Center
Wakayama Research Center of Agriculture, Forestry and Fisheries*

緒 言

‘刀根早生’は果実品質が良く、和歌山県でのカキの主力品種となっている。しかし、渋ガキであるため出荷前に脱渋処理が必要で、一時期に出荷が集中するのを防ぐために、より熟期の早い品種の育成が望まれている。ところが、‘刀根早生’は、雄花がないため花粉が無く、完全種子も形成されないので、通常の交雑育種が行えない。

しかし、‘刀根早生’と同じく完全種子を形成しない‘平核無’では、胚珠のうち一部の受精胚が球状やハート型まで生長し(傍島ら; 1975),開花60日後の未熟胚を培養して幼植物体を得ること(石田ら; 1980)に成功している。

そこで、本試験は‘平核無’の枝変わりである‘刀根早生’を種子親にし、熟期の早い‘西村早生’との交雑個体を胚培養で得るため、個体を効率的に獲得できる未熟胚培養開始時期、増殖したシートの発根方法、順化方法について検討した。また、育成した個体の相対核DNA量から倍数性の推定も行った。

材料および方法

実験 1. 胚培養開始時期の検討

1989年に‘刀根早生’の種子と胚の発達について調査した。1989年5月10日に伊都郡かつらぎ町の樹齢8年生3樹と10年生2樹の‘刀根早生’に‘西村早生’の花粉を受粉した。

受粉は、開花直前の花の花弁を取り、あらかじめ開薬した‘西村早生’の花粉を筆で受粉した後、他の花粉が受粉するのを防ぐため袋掛けを行った。

果実は、受粉80日後と90日後にそれぞれ58果を収穫し、種子の長さと胚の発達程度の関係を調べた。

また、1990年には同じ樹で前年と同様に受粉を行い、受粉40日後(6月20日)、60日後(7月10日)、80日後(8月1日)、100日後(8月20日)に果実を収穫し、奇形果を除いた50果を供試した。果実内の未熟種子から取り出した胚は、Murashige & Skoogの培地の無機窒素成分を1/2に調整した基本培地[以下、(1/2NO₃)MS]にBA 0.1ppm, IBA 0.02ppmを添加した培地を用い、培養は25°C, 2000 lx, 16時間照明条件で行った。そして、胚培養開始時期別に胚数と胚の形態、培養30日後の生存率を調査した。

実験 2. 培養個体のシートからの発根方法

交雑個体のシートからの増殖のため、(1/2NO₃)MS培地+ショ糖3%+BA 5 ppmの

培地を用い2～3cm程度に伸長したシートを切り取り、発根処理を行った。発根処理は、シート基部をIBA 200ppm溶液に数秒間浸漬処理し、(1/2NO₃) MS培地+ショ糖3%の培地に置床し、発根を図った。この発根を促進する方法として、遮光した箱の中で培養する暗黒培養法と発根培地に墨汁(1%)を加え、シート基部を遮光し2000lxで培養する黒色培地法(第1図)を比較した。供試個体数は、暗黒培養法で11個体、黒色培地法で14個体とした。

実験3. 通気フィルターを利用した順化方法

発根し、完全な幼植物体となった個体は、培養容器から取り出し、かん天培地を滅菌水で洗浄して、培土としてバーミキュライトを入れた培養瓶(縦、横および高さ約10cm)へ移植した。

順化では、低湿度条件に馴らすため、まず培養室(25°C, 16時間照明, 2000lx)で、培養瓶の蓋に取り付けた通気フィルター{テフロンメンブランフィルター(孔径0.5μm)}に直径1cmの穴1個を開け、初期順化期間を20, 30, 40日間と変え、以降3穴で8日間保った後、培養室から室内へ出し、1週間蓋全体を少し空けた後、蓋を全開にし、順化率、順化個体の成長について調査した。

実験4. 核DNA量による倍数性の推定

培養した11系統と両親について、カルス化培地[(1/2NO₃) MS+IAA 2ppm+ZEATIN 2ppm]に葉の一部を置床して誘導したカルスと葉を供試した。この試料であるカルス100mgおよび葉に

核解離用液(0.1% TritonX-100; 2ml+100mM NaCl+10mM Na₂EDTA)を加え、細かく裁断し、氷上に5分間放置し、20μmのナイロンメッシュで濾過したものに蛍光色素PI(propidium iodide) 100μg/mlを加えて、フローサイトメーターで核DNA量を調査した。

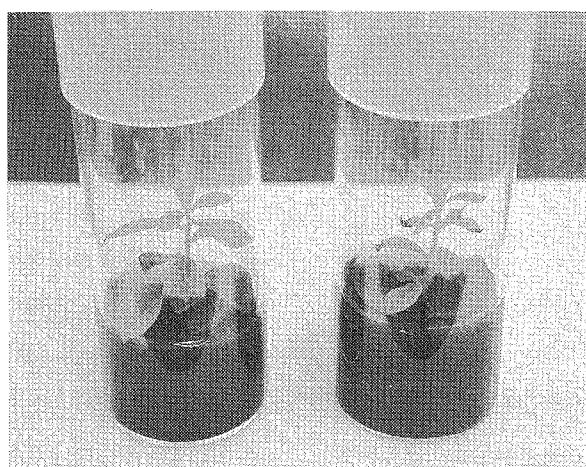
結果および考察

実験1. 胚培養開始時期の検討

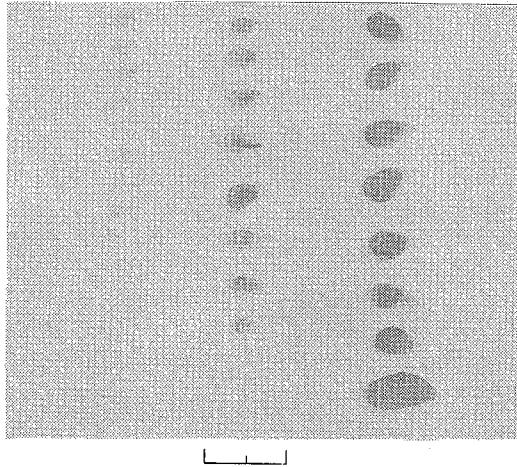
受粉80日後と90日後の果実から取り出した未熟種子(第2図)は、縦径の長さで5段階に分類した。長さ別の種子数は第1表に示したとおり、受粉80, 90日後ともに、縦径5～7mmの割合がそれぞれ50%, 43%と最も高く、次いで3～5mmの35%, 33%であった。10mm以上の種子は、両時期とも全種子の2%程度であった。

58果当たりの得られた種子数は、受粉80日後が350個、受粉90日後が383個で、「刀根早生」では種子の入る子室が1果あたり8あるので、総胚珠数のうち75%, 82%にあたる種子がこの時期までに発達していたと言える。

種子から取り出した未熟胚は、胚の発達順に、球状胚、ハート型胚、魚雷型胚(第3図)に形態で分類した。種子の縦径別に胚の形態を調査した結果、1～3mmの種子には、肉眼で胚を確認できなかった。球状胚は、5mmから7mmの種子でみられ、7mm以上の種子ではほとんど含まれていなかった。ハート型胚の割合は、5～7mmの種子で受粉80日後が13%, 90日後が5%と他



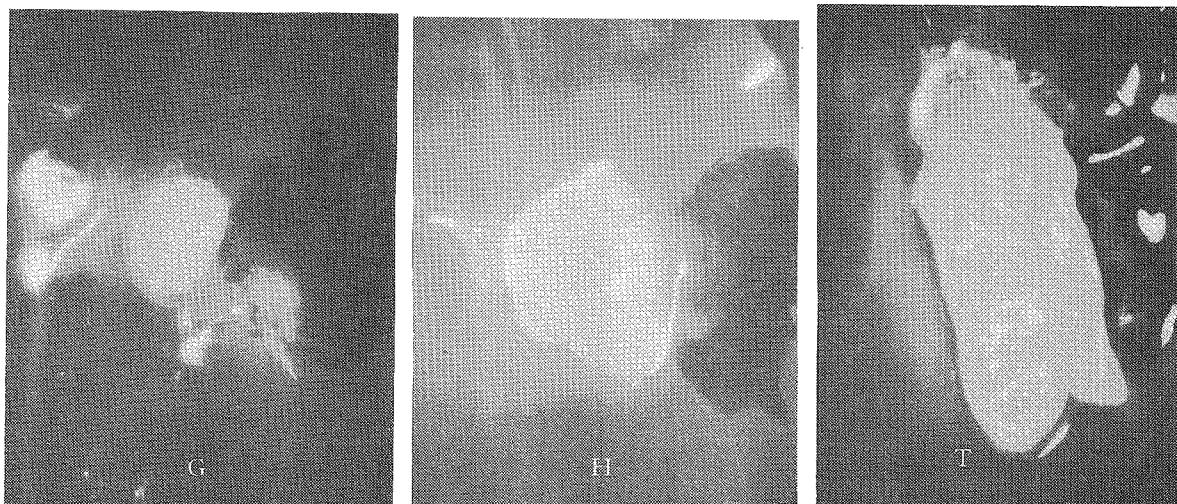
第1図 黒色培地法による発根処理



第2図 刀根早生の未熟種子

第1表 時期別種子の縦径と胚の形態(1989年)

調査時期	供試 果実数	種子の縦径 (mm)	種子数 ^z	胚の形態 ^y		
				G	H	T
受粉80日後	58	1~3	23(7%)	0%	0%	0%
		3~5	124(35)	6	2	0
		5~7	175(50)	35	13	10
		7~10	22(6)	4	4	15
		10~	6(2)	0	2	10
受粉90日後	58	1~3	56(15%)	0%	0%	0%
		3~5	128(33)	12	0	0
		5~7	163(43)	26	5	5
		7~10	30(8)	0	2	36
		10~	6(2)	0	0	14

^z()内は、縦径別の割合^y全種子当たりの割合、G:球状胚、H:ハート型胚、T:魚雷型胚

第3図 摘出したカキ未熟胚の形態

G:球状胚, H:ハート型胚, T:魚雷型胚

径より高かった。魚雷型胚の割合は、5 mmより小さい種子では0%であり、7~10mmの種子では受粉80日後が15%，90日後が36%と他径より高かった。

石田ら(1980)は、開花60日後の‘平核無’の種子を調査し、10~15mmの種子にのみハート型胚が存在したと報告している。しかし、‘刀根早生’を用いた本実験では、受粉80日及び90日後において、ハート型胚は3 mm以上の種子でみられ、ハート型胚からさらに魚雷型胚に発達した胚もみられた。これが品種の違いに由来するのか、今のところ不明である。

これらのことから、‘刀根早生’において胚培養を行う場合、3 mm以上の種子に胚が存在し、7~10mmの種子に発達した魚雷型胚が多いといえる。

1990年、受粉40日後から100日後の時期別に

果実から取りだした種子数は、第2表に示したとおり、受粉40日後から80日後で50果当たり370~387個と差がみられなかったが、受粉100日後では185個と少なかった。これは、発達しなかった種子が退化したためと考えられる。

2割以上黒変した種子の発生率は、受粉40日後で0.8%と最も少なかったが、その後の時期では6%以下であった。

胚の形態は、調査した全ての時期で7割以上が球状胚であった。魚雷型にまで発達した胚は、受粉80日後が19%と他の時期に比べて多かった。

胚の培養30日後の生存率は、球状胚は受粉80日後で20%と高かった。これは、この時期の球状胚がハート型胚に近い形態になっていたためであると考えられる。ハート型胚の生存率は、培養時期が遅くなると生存率は上がる傾向がみられた。魚雷型胚では、受粉60日後で67%と高い培養生

第2表 時期別胚の形態と培養後の生存率(1990年)

調査時期	供試 果実数	種子数	黒変種子 ² 率	胚数	胚の形態 ^Y			培養胚の生存率 ^X			生存 個体数
					G	H	T	G	H	T	
受粉40日後	50	387	0.8%	47	38(81%)	9(19%)	0(0%)	3%	11%	—	2
受粉60日後	50	379	5.3	98	80(82%)	9(9%)	9(9%)	5	11	67%	11
受粉80日後	50	370	2.2	65	46(71%)	7(11%)	12(19%)	20	14	25	13
受粉100日後	50	185	5.9	52	39(75%)	11(21%)	2(4%)	8	18	0	5

²種子の2割以上が黒く変色している種子を黒変種子とした。^YG: 球状胚, H: ハート型胚, T: 魚雷型胚, () 内は形態別の割合^X培養30日後の生存個体数, 培養条件: (1/2NO₃) MS+BA 0.1ppm+IBA 0.02ppm, 25°C, 2,000lx, 16時間照明

存率を示し, 80日後, 100日後と生存率が下がっていった。そして, 50果当たりの培養30日後の生存個体数は, 開花60日後で11個体, 80日後で13個体となった。

これらのことから, ‘刀根早生’では, 受粉60日後から80日後にかけてハート型胚や魚雷型胚の割合が増え, 培養後の生存率も高いことがわかる。そのため, 培養開始適期は, 受粉60日後から80日後と判断される。

実験2. 培養個体のシュートからの発根方法

発根率は第3表に示したとおり, 暗黒培養法の45.5%に比べて, 黒色培地法では78.6%と高かった。発根処理期間中のシュートの伸長は暗黒培養法で著しく, シュート長は暗黒培養法で42.4mmと黒色培地法の28.4mmより長かった。

村山ら(1989)は‘平核無’で暗黒処理し, 置床後9日間で発根促進効果が高かったが, 暗黒期間

が12日以上になるとシュートが黄化し, 衰弱する傾向が認められたと報告している。

本実験でも暗黒培養法で約30日間処理を続けた結果, シュートの徒長や葉の一部に黄化や落葉が見られた(第4図)。これらのことから, 黒色培地法は, 培養個体の黄化は認められず, 発根率も暗黒培養法に比べて高いことから, カキの発根処理方法として有効であると考えられる。

実験3. 通気フィルターを利用した順化方法

1穴通気フィルターで行った初期順化期間が順化率に与える影響は, 第4表のとおりで期間が長いほど順化率は高くなり, 40日間の場合71%であった。カビの発生は, 初期順化期間との間に一定の関係は認められなかった。

カキのように細根, 毛根の発生が少ない品目では培養個体の順化は難しい。カキの順化率を上げるためにには, 充実したシュートを用いる(文室,

第3表 暗黒処理部位の違いが発根と生育に及ぼす影響(1990年)

処理区	培地置床時		培養30日後		
	シュート長	葉数	発根率	シュート長	葉数
暗黒培養法	28.3mm	6.6	45.5%	42.4mm	8.7
黒色培地法	24.0	6.3	78.6	28.4	8.4

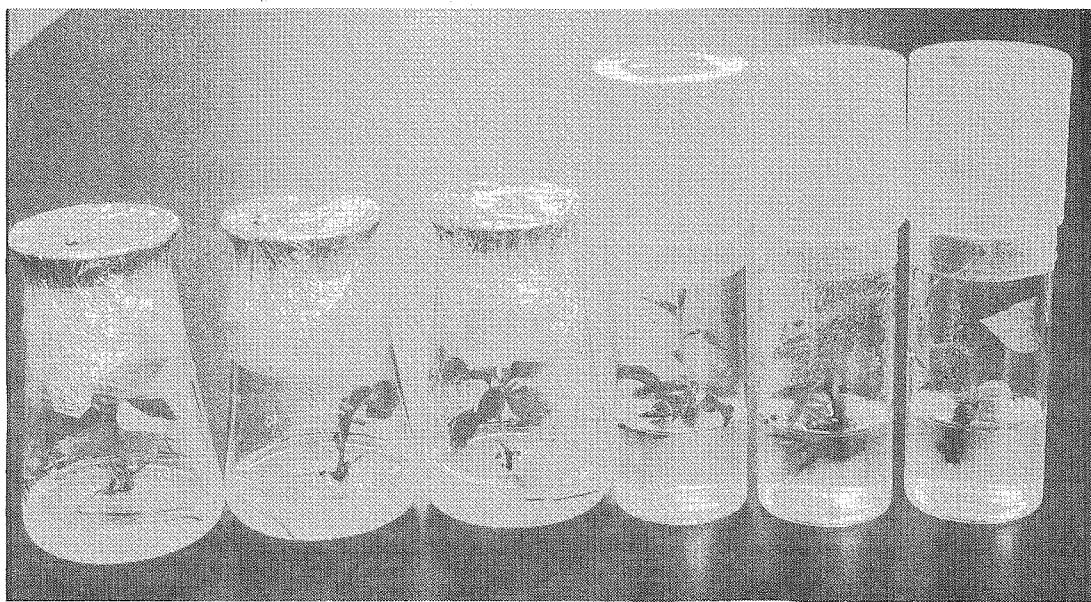
黒色培地: (1/2NO₃) MS培地+墨汁1%

両区ともシュート基部にIBA 200ppm溶液に数秒間浸漬する発根処理を行った。

第4表 通気フィルターを利用した順化(1990年)

初期順化期間 (通気フィルター1穴)	順化個体		順化率	カビ発生率
	シュート長	葉数		
20日間	21.3mm	7.5	63%	13%
30	43.0	9.8	67	33
40	21.3	7.4	71	0

順化方法: 初期順化(通気フィルター1穴)→通気フィルター3穴8日間
→蓋をゆるめる7日間→蓋を取る



第4図 発根処理方法とショートからの発根（1994年）

黒色培地法：左3個体、発根がわかるよう通常の寒天培地に移植
暗黒培養法：右3個体

1999) ことや温度や照明時間などの環境条件を茎長培養と同様に整える(鉄村ら, 1993)ことが重要であるとされている。いずれの報告も、順化は1カ月以上の長期間にわたる作業で、個体を低湿度に徐々にならすのは慎重さが要求されるが、本実験の通気フィルターを用いる方法は、湿度管理が簡便で順化率が7割程度と失敗の少ない方法であると考えられる。

実験4. 核DNA量による倍数性の推定

北島ら(1990)は、カキの染色体数を調査し、‘刀根早生’が $2n=135$ の9倍体であること、‘西村早生’が $2n=90$ の6倍体であることを明らかにした。

本実験で得られた交雑個体の染色体数は、両親である‘刀根早生’と‘西村早生’の中間の異数体となっていると考えられた。しかし、カキの染色体は小さく、数も多いので染色体数の調査は難しいと考えられた。

田村ら(1998)は、カキの核DNA量を測定し、カキ属の倍数性と核DNA量から求めたゲノムサイズとの間に強い相関が見られることを明らかにした。核DNA量は、染色体を蛍光色素で染色し、蛍光の強さをフローサイトメーターで測定するため調査が簡便である。そこで、交雑個体の両親に対する相対核DNA量から交雑個体の染色体数を推定し、これらの系統の倍数性を検討した。

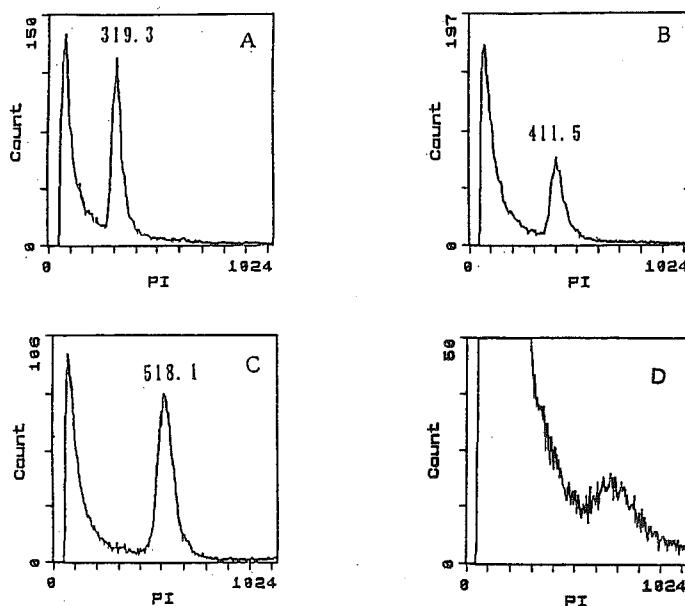
フローサイトメーター分析は第5図のように、葉由来カルスでは蛍光の強さに明確なピークがみられたが、葉を材料に用いた場合明瞭でなかった。そこで、交雑個体の核DNA量の測定は、全て葉由来カルスを材料に行った。

交雑個体11系統の両親に対する相対核DNA量は第5表のように、‘西村早生’に対して1.12～1.30倍、‘刀根早生’に対して0.69～0.89倍となった。‘西村早生’と‘刀根早生’の相対DNA含量から推定される染色体数は、供試した11系統のうちTN8を除く10系統で、‘西村早生’比で推定した値が‘刀根早生’から推定した染色体数に比べて9～7本程度多く、正確な染色体数の決定にはいたらなかった。しかし、交雑個体はいずれの系統も両親の中間の染色体数であると考えられる。

第5表 交雑個体の相対DNA含量の比較（1996年）

系統名	対‘西村早生’比 (2n=90)	対‘刀根早生’比 (2n=135)
TN7	1.28 (115.1) ^z	0.79 (106.4)
TN8	1.30 (117.2)	0.89 (119.9)
TN21	1.27 (114.0)	0.78 (105.4)
TN23	1.29 (116.0)	0.79 (107.2)
TN40	1.27 (114.0)	0.78 (105.4)
TN56	1.24 (112.0)	0.77 (103.5)
TN95	1.24 (111.3)	0.76 (102.9)
TN101	1.18 (105.8)	0.72 (97.8)
TN111	1.22 (110.1)	0.75 (101.8)
TN112	1.12 (100.9)	0.69 (93.3)
TN118	1.27 (114.7)	0.79 (106.0)

^z()の数字は計算上の染色体数



第5図 フローサイトメーターによる交雑個体の相対DNA含量の測定（1996年）

A : 西村早生（カルス）, B : TN23（カルス）,
C : 刀根早生（カルス）, D : 刀根早生（葉）

えられる。

北島ら(1992)は、‘平核無’を含む3品種の染色体数 $2n=135$ のカキについて放任受粉で得た胚培養個体は、染色体数106~114本の異数体であったと報告している。本試験の結果も同様に、

‘刀根早生’と‘西村早生’の交雑個体は、両親の中間の染色体数を持つ異数体である可能性が高いと考えられる。

以上のことにより順化した15系統について、鉢上げし、ポットで1年間育成後、穂木を採取し、1992年から1995年にかけて那賀郡那賀町名手上の‘刀根早生’と粉河町の果樹園芸試験場紀北分場内の‘富有’カキの樹に高接ぎした。そして、1994年に1系統、1995年に別の3系統、さらに1996年に4系統が着果した。

この結実した4系統(TN 7, TN 8, TN 21, TN 23)の果実特性は第6表のとおりで、1果実

当たり完全種子がTN23に7個存在していた。その他の系統では、完全種子は1個以下とほとんどみられなかった。染色体数と種子形成能力については密接に関係していると考えられるが、調査果実数も少なく未結果系統も多いので、他の果実形質と併せ、今後の調査が必要である。

摘要

‘刀根早生’と‘西村早生’の交雑個体作出のため胚培養開始時期、増殖したシートの発根方法、培養個体の順化方法と育成系統の倍数性を検討した。

1. ‘刀根早生’未熟胚の培養開始適期は受粉60日から80日後にかけてで、3mm以上の種子に含まれる球状胚、ハート型胚や魚雷型胚の培養を行うことによって、個体が獲得できた。

第6表 結実した系統の果実特性（1996年）

系統名	結実数	果形		果実重 (g)	斜線溝	果頂 裂果	ヘタ すき	カラーチャ ート(果 頂)	糖度 (%)	含核数		褐斑
		縦断面	横断面							完全種子	しいな	
刀根早生		方 形	方 形	220.9	浅有	無	無	黄 橙	4.1	14.8	0	0 無
TN7	5	方 形	方円形	183.2	無	無	無	濃 紅	7.4	17.7	0.8	0.3 無
TN8	3	方 形	円 形	148.2	無	無	無	黄 橙	4.0	22.1	0.7	7.3 無
TN21	4	扁円形	円 形	135.9	浅有	無	無	橙 色	6.0	—	0.3	1.7 無
TN23	1	扁円形	方円形	242.0	無	無	中	橙 色	5.5	17.6	7	0 中

脱済処理：25°C, 24時間炭酸ガス脱済、調査協力；和歌山県果樹園芸試験場紀北分場

2. カキ培養個体のシートは、IBA 200ppmでシート基部を浸漬し墨汁1%を加えたホルモンフリー培地に置床し、2000lxで培養する暗黒培地法を用いると葉の黄化も見られず、8割程度の個体が発根した。
3. 培養物の順化では、通気フィルター1穴で40日間その後3穴で8日間行い、1週間蓋全体を少し空けた後、蓋を全開することによって、7割程度の個体で順化に成功した。
4. 順化した交雑個体の相対DNA量から、いずれの系統も両親の中間の染色体数を持つ異数体である可能性が高いと考えられた。
5. カキでは、異数体と考えられる個体でも培養することによって完全な植物体に生育することがわかった。

謝 辞

本研究に際し、刀根早生の樹をお借りした松島良樹氏、果実の調査に協力していただいた和歌山県果樹園芸試験場紀北分場の諸氏並びにJA県農高野口支所田嶋良純氏、核DNA含量調査の指導をいただいた近畿大学生物理工学部田村美穂子（現カリフォルニア大学デービス校）氏に深く感謝の意を表する。

引用文献

- 石田雅士・稻葉昭次・傍島善次.1980.カキ平核無未熟胚の組織培養.京府大学報農.32:20-24
 _____・小西昌美・北島宣.1990.‘平核無’未熟種子の発育不全について.園学雑.59:65-73
 北島宣・石田雅士・庄東紅.1990.栽培カキの染色体数について.園学雑.59:289-297.
 _____・_____・_____.1992.カキ無核品種の種子形成および染色体数.園学雑.60:747-754.
 田村美穂子・田尾龍太郎・米森敬三.1998.カキ属数種の倍数性とゲノムサイズ.園学雑.67:306-312.
 鉄村琢哉・田尾龍太郎・行永壽二郎.1993.カキ‘西村早生’組織培養個体の順化に及ぼす要因とその圃場生育.園学雑.62:533-538.
 福井博一・西本和男・中村三夫.1992.培養したカキのシートからの発根能力の品種間差異.園学雑.60:821-825.
 文室政彦.1999.カキ(*Diospyros kaki* L.f.)の低樹高栽培に関する研究.近畿大学学位論文.
 傍島善次・石田雅士・稻葉昭次.1975.カキ果実の発育に関する研究(第2報).平核無の種子の発育不全について.園学雑.44:1-6.
 村山秀樹・田尾龍太郎・田中辰美.1989.カキ数品種のin vitroでのシート増殖と発根.園学雑.58:43-47.

Summary

To generate hybrids between *Tonewase* and *Nishimurawase*, studies were carried out on time of embryo culture, methods of promoting shoot rooting and controlling cultivated individuals. The ploidy of the hybrid was also investigated.

1. The optimum timing for cultivating premature embryos of *Tonewase* is 60 to 80 days after pollination. Globular-, heart-, or torpedo-shaped embryos contained in seeds over 3mm produced individuals.
2. By soaking the bottom of the shoot in IBA 200ppm, bedding onto hormone-free culture medium containing 1% India ink (dark medium), and cultivating with 2000lx, about 80% of the individuals were stimulated to root without the leaves turning yellow.
3. About 70% of the individuals were successfully adjusted by the following steps: using a one-hole filter for 40 days; a 3-hole filter for 8 days; opening the partially for one week; opening the lid fully.
4. Studies on the relative quantity of nuclear DNA revealed that the adjusted hybrid individuals could produce the heteroploid that contained the intermediate DNA amount of the parents.
5. Our results showed that the individual persimmon could become a complete plant even if it was heteroploid.