

カンキツの不定胚形成における内生オーキシンの影響

池田 敬^{1*}・児島清秀^{2**}・薬師寺博^{3***}・小林省蔵³・野並 浩¹

¹ 愛媛大学農学部 790-8566 松山市樽味

² 農林水産省果樹試験場カンキツ部口之津 859-2501 長崎県南高来郡口之津町乙

³ 農林水産省果樹試験場カキ・ブドウ支場 729-2494 広島県豊田郡安芸津町三津

Effects of Endogenous Auxin on Citrus Somatic Embryogenesis

Takashi Ikeda^{1*}, Kiyohide Kojima^{2**}, Hiroshi Yakushiji^{3***}, Shozo Kobayashi³ and Hiroshi Nonami¹

¹ College of Agriculture, Ehime University, Tarumi, Matsuyama 790-8566

² Department of Citriculture, Kuchinotsu, National Institute of Fruit Tree Science, Kuchinotsu, Nagasaki 859-2501

³ Persimmon and Grape Research Center, National Institute of Fruit Tree Science, Akitsu, Hiroshima 729-2494

Summary

This study investigated the changes in endogenous auxin concentration during embryogenesis of citrus (*Citrus sinensis* Osb.) in tissue culture. Embryogenic callus (EC) was induced from ovules of 'Trovita orange' and 'Oomishima navel'. In both varieties, the EC having greater capacity for embryogenesis had a correspondingly higher endogenous indole-3-acetic acid (IAA) concentration. When the EC in 'Washington navel' and 'Oomishima navel' were cultured on hormone-free media which can induce embryogenesis, the IAA concentration increased for 2 days, then rapidly decreased and stabilized 14 days later. These results suggest that the decrease in IAA concentration is closely related to citrus embryogenesis.

Key Words: *Citrus sinensis* Osb., Embryogenic callus, GC-MS-SIM, Indole-3-acetic acid.

緒言

オーキシンは不定胚分化と強い関連があることが知られている(高橋・増田, 1994)。カンキツの珠心由来のEmbryogenic callus (EC)をホルモンフリー培地に移すと不定胚分化が起こる(小林ら, 1984; Kobayashiら, 1985)。また, 抗オーキシン作用のある7-aza indoleなどを含む培地での培養や(Kochba・Spiegel-Roy, 1977), 内生オーキシンを下げるとされている γ 線の照射(Kochba・Spiegel-Roy, 1977)とガラクトース, ラクトースを含む培地での培養(Kochbaら, 1978)で不定胚形成が促進されることが報告されている。これらの知見から, カンキツでは内生オーキシンの低下が不定胚形成を誘導していると推察されるが, カンキツECからの不定胚形成過程における内生オーキシン濃度の変化は調べられていない。そ

こで, カンキツECにおける不定胚形成能と内生インドール酢酸(Indole-3-acetic acid, IAA)濃度との関係, および不定胚誘導過程における内生IAA濃度の変化について調査した。

材料および方法

植物材料として'大三島ネーブル'(*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka), 'ワシントンネーブル'(*C. sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka)および'トロビタオレンジ'(*C. sinensis* Osb.)の珠心から誘導されたECを使用した(小林ら, 1984)。ECを, 20 mg \cdot l⁻¹カイネチン, 50 g \cdot l⁻¹ショ糖および3 g \cdot l⁻¹ゲルライトを含むMurashige・Tucker (MT) (Murashige・Tucker, 1969)培地で継代培養し, 不定胚分化能の異なった系統を選別した。不定胚分化能は, 異なる胚珠から誘導されたECをホルモンを含まないMT培地で培養し, 培養後2ヶ月における不定胚が形成されたEC数と, 不定胚に発達しなかったEC数より不定胚形成率から求めた。評価は不定胚形成率より4段階で行い, 0: なし, 1: 1-10%, 2: 11-50%, 3: 50%以上とした。不定胚形成能力の異なった'トロビ

1999年2月19日 受付. 1999年8月16日 受理.

*現在: 京都府立大学農学部 606-8522 京都市左京区下鴨半木町

**現在: 新潟大学農学部 950-2181 新潟市五十嵐2の町

***現在: 農林水産省果樹試験場 305-8605 つくば市藤本

タオレンジ' と '大三島ネーブル' の EC 中の内生 IAA 濃度を, Sakurai ら (1985) の方法に準じインドールプロピオン酸を内部標準に利用して, 高速液体クロマトグラフ (LC-3A, 島津社製) で分離し, 蛍光検出器 (励起波長: 280nm, 蛍光波長: 350nm; RF-530, 島津社製) により同定・定量した.

次に, 上記固形培地と同様の組成の液体培地で 'ワシントンネーブル' と '大三島ネーブル' の EC を継代培養し, その後ホルモンを含まない液体培地に移して不定胚の形成を促した. 40ml の培養液を入れた 100ml 三角フラスコ中で 100rpm で振とう培養し, 移植後, 0, 1, 2 日目, 1, 2, 3, 4, 6 週目の EC を採取した. それらの内生 IAA 濃度は, 内部標準として $^{13}\text{C}_6$ -IAA を使用した GC-MS (QP-5000, 島津社製) の選択イオンモニタリング法 (SIM) により同定・定量した (Kojima ら, 1994).

結果および考察

同一品種から得られた不定胚形成能の異なる EC の内生 IAA 濃度を第 1 図 ('トロビタオレンジ' と '大三島ネーブル') に示した. いずれの品種においても不定胚誘導能力の高い EC ほど内生 IAA 濃度が高かった. 特に '大三島ネーブル' においては, 不定胚形成率が 50% 以上を示した不定胚形成能が 3 の EC 系統は, 不定胚形成をしない不定胚形成能が 0 の EC 系統の約 4 倍であった (第 1 図). Ribnicky ら (1996) はニンジン EC 誘導時において, 培地に添加された外生合成オーキシシン類が内生 IAA 濃度に

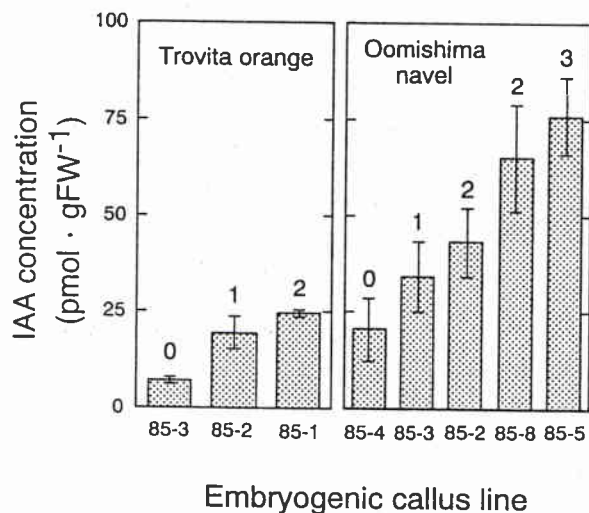


Fig. 1. Comparison of IAA concentrations in 'Trovita orange' and 'Oomishima navel' embryogenic callus lines having different abilities for embryogenesis. Numbers above columns indicate the ability of embryogenesis (0: none, 1: 1-10%, 2: 11-50%, 3: over 50%). The ability for embryogenesis was estimated by No. of embryo/ embryogenic callus ratio 2 months after the calli were transferred to a hormone-free MT medium. Vertical bars indicate standard errors (n=3).

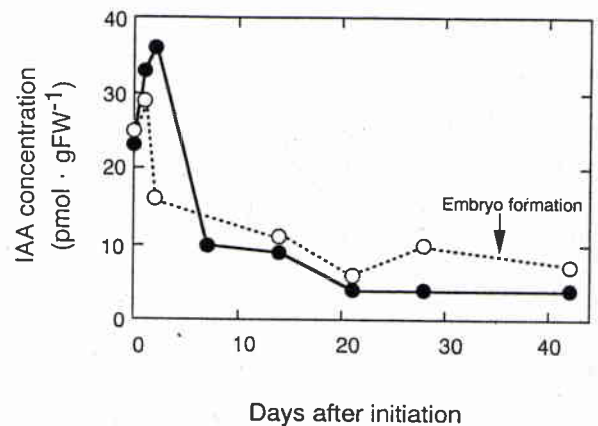


Fig. 2. Changes in the IAA concentration during embryo-formation of citrus embryogenic callus. Open circles (○), 'Washington navel'. Closed circles (●), 'Oomishima navel'.

のような影響を与えるかを調べ, EC 形成には必要であるが, 外生オーキシシンは内生 IAA 濃度に影響を与えないと結論している. 本実験の EC 誘導培地はオーキシシンフリーであったため, カルス自身の内生オーキシシンのみで EC を形成する必要があった. これらのことから, カンキツの不定胚形成には EC の段階における高い内生オーキシシン生成能力が必要であると推察された.

不定胚誘導培地に移植後の EC 中の IAA 濃度を経時的に測定した結果 (第 2 図), 'ワシントンネーブル' および '大三島ネーブル' ともに移植後直ちに IAA 濃度は増加した. 'ワシントンネーブル' では 1 日目に IAA が $29 \text{ pmol} \cdot \text{gFW}^{-1}$, '大三島ネーブル' では 2 日目には $35 \text{ pmol} \cdot \text{gFW}^{-1}$ となったが, その後急速に減少した. そして不定胚誘導開始後 2 週間目には両品種とも約 $10 \text{ pmol} \cdot \text{gFW}^{-1}$ まで低下し, その後大きな変化はなかった. 両品種の不定胚形成は培養開始後 35 日目から観察され始めた. この結果から不定胚誘導過程の初期段階でカルス細胞内の IAA 濃度が減少することが明らかとなった.

オーキシシンを含む培地でニンジン EC を培養すると不定胚形成が阻害される (高橋・増田, 1994) ことや IAA を含む培地でカンキツ EC を培養すると不定胚形成が阻害されることから (Kochba・Spiegel-Roy, 1977), オーキシシン (IAA) がカンキツ不定胚形成に深く関わっていることが推察される. また Michalczuk ら (1992) は, オーキシシンフリー培地で培養したニンジン EC の IAA 濃度を分析し, 本研究と同様に, 減少したことを報告している. このことは, 内生 IAA の減少が不定胚形成の重要な誘導条件であることを強く示す.

以上の結果から, 不定胚形成過程の EC 段階では高い内生 IAA 濃度を必要とするが, EC から不定胚に分化する過程においては, 誘導初期に内生 IAA 濃度が減少し, 低濃度で推移することが確認された.

摘 要

本研究ではカンキツ (*Citrus sinensis* Osb.) の不定胚形成能と内生インドール酢酸 (IAA) の関係, および不定胚形成過程での内生 IAA 濃度の変化について検討した。

Embryogenic callus (EC) はオーキシンを含まない培地で 'トロビタオレンジ' と '大三島ネーブル' および 'ワシントンネーブル' の胚珠から得られた。不定胚形成能力が高いカルスほど内生 IAA 濃度は高かった。EC をホルモンフリー培地で培養すると, IAA 濃度は培養後 2 日目まで増加し, その後減少した。これらの結果から, EC の段階では高い内生オーキシン濃度を必要とするが, 不定胚誘導では内生 IAA 濃度の減少が関係していることが示唆された。

引用文献

- 小林省蔵・池田 勇・中谷宗一. 1984. オレンジ (*Citrus sinensis* Osb.) 胚珠からの珠心カルスの誘導と再分化植物体の均一性について. 果樹試報. E5: 43-54.
- Kobayashi, S., I. Ikeda and H. Uchimiya. 1985. Conditions for high frequency embryogenesis from orange (*Citrus sinensis* Osb.) protoplasts. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 4: 249-259.
- Kochba, J. and P. Spiegel-Roy. 1977. The effects of auxins, cytokinins and inhibitors on embryogenesis in habituated ovular callus of the Shamouti orange (*Citrus sinensis*). *Z. Pflanzenphysiol.* Bd. 81. S. 283-288
- Kochba, J., P. Spiegel-Roy, S. Saad and H. Neumann. 1978. Stimulation of embryogenesis in *Citrus* tissue culture by galactose. *Naturwissenschaften* 65: 261-262
- Kojima, K., Y. Yamada and M. Yamamoto. 1994. Distribution of ABA and IAA within a developing Valencia orange fruit and its parts. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 63: 335-339.
- Michalczyk, L., T. J. Cooke and J. D. Cohen. 1992. Auxin levels at different stages of carrot embryogenesis. *Phytochemistry* 31: 1097-1103.
- Murashige, T and D. P. H. Tucker. 1969. Growth factor requirements of citrus tissue culture. *Proc. 1st Intl. Citrus Symp. Vol. 3. Univ. California, Riverside:* 1155-1161.
- Ribnicky, D. M., N. Ilic, J. D. Cohen and T. J. Cooke. 1996. The effects of exogenous auxins on endogenous indole-3-acetic acid metabolism: The implications for carrot somatic embryogenesis. *Plant Physiol.* 112: 549-558.
- Sakurai, N., M. Akiyama and S. Kuraishi. 1985. Roles of abscisic acid and indoleacetic acid in the stunted growth of water-stressed, etiolated squash hypocotyls. *Plant Cell Physiol.* 26: 15-24.
- 高橋信孝・増田芳雄. 1994. 植物ホルモンハンドブック 上. 培風館. 東京. p. 655.