

カンキツの胚乳培養と葯培養

藤田賢輔、磯部 暁

Endosperm and Anther culture in Citrus

Kensuke Fujita and Akira Isobe

I. 緒言

貿易の自由化、消費者嗜好の多様化・高品質化など今日の果樹産業を取り巻く環境は厳しく、産地間競争は激しい状況下にある。このような状況の下、消費者ニーズに対応できる高品質品種の育成は今後の果樹産業の発展のためには極めて重要な課題の一つである。

これまで突然変異育種、交配育種など様々な方法により優良な品種が育成されてきた。なかでも組織培養は新しい育種法として近年盛んに行われ、当研究所でも胚培養を一般化した技術として利用し、育種効率向上を図っている。今回報告する胚乳培養及び葯培養は、前者は無核性カンキツの育成を目的とし、後者はヘテロ性の高いカンキツより純系を得て、育種効率向上を図ることを目的としており、これまでに一定の成果が得られたのでここに報告する。

II. 材料及び方法

1. 胚乳培養

1) 培養時期の検討
当研究所内に植栽の18年生「バンペイユ」を材料に「カワチバンカン」を授粉し、授粉後50~100日目の種子を観察するとともに、70日及び80日目の種子より胚乳を取り出し培養した。

培養は、まず果実より取り出した種子を70%アルコールで数秒、0.5%アンチホルミンで10分間殺菌した後、滅菌水で3回洗浄した。その後実態顕微鏡下で外・内種皮、珠心組織、胚を取り除き培養した。培地はMurashige and Tucker (1969, MT) を基本培地に、5%スクロース、0.8%寒天末、pH5.7とした。生長調整物質には2・4-D、NAA、BA、カザミノ酸(CH)を使用し、培養は28℃、暗黒下で行い、培養後30日目に調査した。

2) カルス誘導培地の検討

12年生「青島温州」に「トロピタオレンジ」を授粉し、授粉後90日目前後の種子を材料に、以下について検討した。なお、生長調整物質を除く培地、培養法及び調査日

については前試験と同様とした。

(1) カルス形成に対する生長調整物質の影響

CH1000mg/lの培地に、2・4-D 0~5.0mg/l、BA 0~5.0mg/lを組み合わせ添加し、胚乳の反応について検討した。また、CH濃度について2・4-D 2.0mg/l + BA 5.0mg/lの培地に、CH濃度を0、100、500、1000mg/lとし検討した。

一方、残存胚のカルス化が考えられることから、2・4-D 2.0mg/l + BA 5.0mg/l + CH1000mg/lの培地に生育ステージ毎に胚を区分しその反応について検討した。

(2) カルス形成に対する胚の影響

胚乳を実態顕微鏡下で胚を除去したもの及び除去しないものに区分し、2・4-D 2.0mg/l + BA 5.0mg/l + CH1000mg/lの培地に置床し、その反応について検討した。

3) カルス細分化培地の検討

2・4-D 2.0mg/l + BA 5.0mg/l + CH500mg/lの培地により、暗黒下で20日毎に3回継代した「青島温州」のカルスを材料とした。5%スクロースの培地に、GA₃濃度を0、1、3、5、7、10mg/lとし、カルスの再分化について検討した。なお培養は25℃、2000Lux、16時間照明下で行い、また供試したカルスは3倍体であることを確認したものを使用した。

2. 葯培養

1) 培養方法の検討

当研究所の無加温ビニルハウス内に植栽の「不知火」より、葯培養に適する1核期前後の花蕾を含有する花蕾を採取し、4℃の低温庫内で4~7日間保存した。

培養にあたっては、顎を除いた花蕾を70%エタノールで数秒、0.5%アンチホルミンで10分間殺菌し、滅菌水で3回洗浄した後、葯を取り外し培地に置床した。

培地はMurashige and Skoog (1962, MS) を基本培地に、0.2%ゲルライト、pH5.7とし、6cmプラスチックシャーレに8ccの培地を注入し、1シャーレ当たり4~5個の花蕾の葯を置床した。培養は25℃、暗黒下で行い、調査は置床2ヶ月後とした。

(1) 生長調整物質の影響

IAA、カイネチンをそれぞれ0、0.02、0.2、2.0mg/lとし、単独あるいは組み合わせ培養した。また、IAA 0.2mg/l+カイネチン0.02mg/l及びGA₃ 1.0mg/lを単独あるいは組み合わせ培養した。なお、培地のスクロース濃度は5%であった。

(2) 胚様体形成に及ぼすGA₃の影響

GA₃の働きを知るため、以下により検討した。

tr1: IAA0.2mg/l+カイネチン0.2mg/l+GA₃1.0mg/lで培養

tr2: IAA0.2mg/l+カイネチン0.2mg/lで培養

tr3: IAA0.2mg/l+カイネチン0.2mg/lで20日間培養後、同一培地へ移植

tr4: IAA0.2mg/l+カイネチン0.2mg/lで20日間培養後、tr1へ移植

tr5: IAA0.2mg/l+カイネチン0.2mg/lで20日間培養後、GA₃1.0mg/lへ移植

tr6: IAA0.2mg/l+カイネチン0.2mg/lで40日間培養後、同一培地へ移植

tr7: IAA0.2mg/l+カイネチン0.2mg/lで40日間培養後、tr1へ移植

tr8: IAA0.2mg/l+カイネチン0.2mg/lで40日間培養後、GA₃1.0mg/lへ移植

なお、培地のスクロース濃度を5%とし、調査は培養3ヶ月及び4ヶ月後に行った。

(3) スクロース濃度及び糖種類の影響

スクロース濃度については、培地にあらかじめIAA 0.02mg/l+カイネチン0.2mg/l+GA₃ 1.0mg/lを添加し、スクロース濃度を0.03~0.25molとして加え検討した。

また、糖種類では上記と同一の生長調節物質を添加した培地に、0.2molのグルコース、ガラクトース、フルクトース、ソルビトール、ラクトース、マルトース、及びスクロースを加え検討した。

④ 花蕾大きさの検討

IAA 0.02mg/l+カイネチン0.2mg/l+GA₃ 1.0mg/l、5%スクロースを添加した培地に、花蕾の大きさを成蕾の1/4(開花前10日)、1/2(5日)、成蕾に区分し検討した。なお、1/4の大きさの花蕾は4分子から1核期前期の花粉を含有していた。

2) 薬培養における品種間差

当研究所内露地栽培の‘太田ボンカン’、‘中野3号ボンカン’、‘早香’、‘ありあげ’、‘陽香’及び当研究所育成中の清見交雑種3系統(×ミネオラ、フェアチャイルド、福原オレンジ)を材料に、IAA 0.02mg/l+カイネチン0.2mg/l+GA₃ 1.0mg/lを添加した5%スクロース含有のMS培地で培養した。

3) 薬培養により得られた植物体の形質

‘不知火’の薬培養により薬外に露出してきた胚様体を、生長調整物質無添加で、2%のスクロースを含むMS培地に置床し、発根、発芽を促進した。培地はφ10cmのガラス管ビンに8cc注入したものを使用し、培養は25℃、1000Lux、16時間照明で行った。

発根、発芽のみられた植物体については、根端を取り生山(1981)の方法により染色体数を調査した後、胚芽接ぎを行い、翌年6月にガラス室内の2年生カラタチに31個体を寄せ接ぎし、生育促進を図った。同年12月にHiraiら(1987)の方法により葉を用いパーオキシダーゼのアイソザイム分析を行う一方、各個体の接木部上部の伸長量及び第1回伸長時に着生した平均的な葉5~10枚の葉身の長さを調査した。なお、アイソザイム分析では‘清見’、‘不知火’、‘中野3号ボンカン’、‘吉田ボンカン’、‘早香’、不知火珠心胚実生2系統を対照とした。

III 結果及び考察

1. 結果

1) 胚乳培養

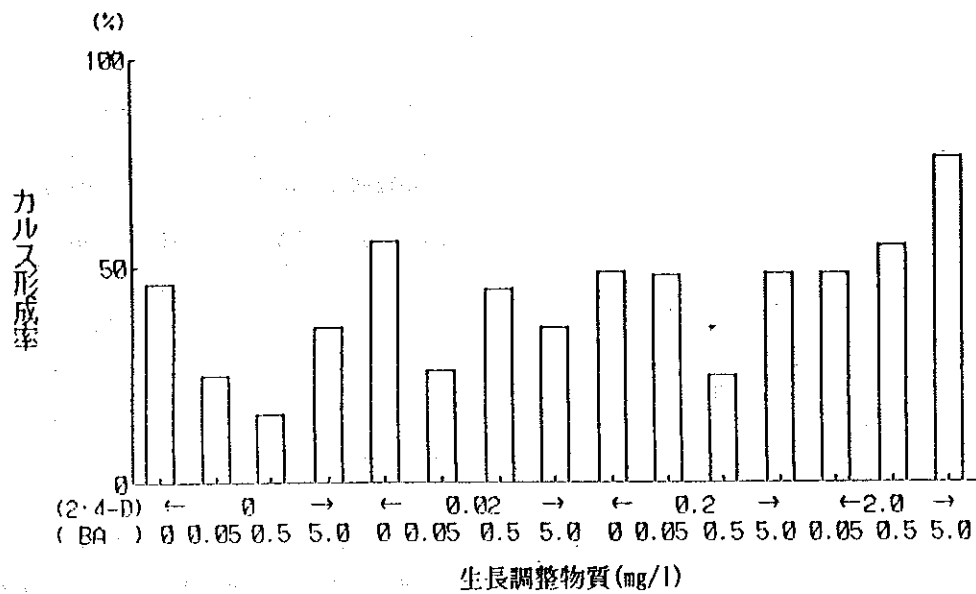
(1) 培養時期の検討

胚乳の形成過程を観察した結果、授粉後60日目頃より確認され、70日目では胚のう内を充滿するほどに生長するが内容物はゲル状であった。この頃になると、胚の大きさは種子長の1/13~1/5であった。80日目では内容物は硬く、乳褐色を呈し、胚は種子長の1/2~3/4に成長していた。90日目になると胚乳は完全に消化され、種子内は胚で充滿していた。

このことから、授粉後70日及び80日目の胚乳を培養し、その結果を第1表に示した。70日目では胚乳に反応がなく、培養2日後より内容物の漏出が始まり、次第に萎凋していった。80日目では生長調整物質添加の培地で低率であるがカルスの形成があり、無添加では反応することはなかった。

第1表 ‘不知火’の交配70、80日後のカルス形成率

生長調節物質	交配後日数	
	70日	80日
2・4-D		
mg/l	%	%
0	0	0
2.0	0	2.7
0	2.0	9.5



第1図 ‘青島温州’の胚乳カルス形成に対する生長調整物質の影響

(2) カルス誘導培地の検討

カルスは培養後15日目頃より肉眼で確認でき、白色の小粒状であった。発生の部位は珠孔部周辺が多く、カラザ部や胚乳全体からの分化もあった。全てのカルスが正常に生育することはなく、新鮮培地に継代しても次第に褐変していくものが多くみられた。

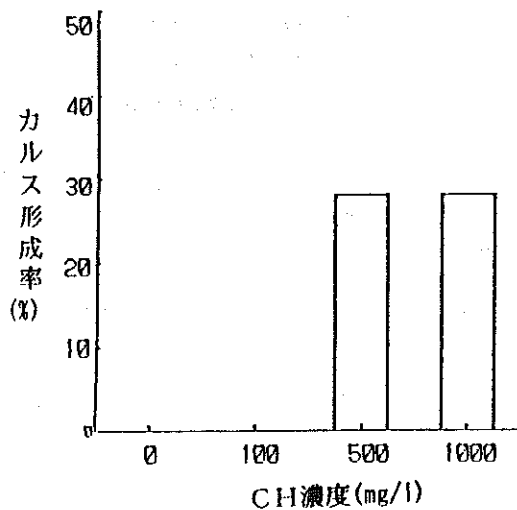
① カルス形成に対する生長調整物質の影響

2,4-DとBAを組み合わせ、検討した結果を第1図に示した。カルス形成は2,4-D添加でやや高くなる傾向にあり、2.0mg/lではBA濃度に関係なく形成率は高く、2

・4-D 2.0mg/l+BA 5.0mg/lでは全ての組み合わせの中で最も高くなった。

CH濃度の結果を第2図に示した。0 mg/l、100mg/lではカルス形成がなく、500mg/l、1000mg/lでカルスが得られ、形成率は同程度であった。

生育ステージ別の胚を培養した結果を第2表に示した。供試した全てのステージで、カルスは形成されたものの形成率はかなり低く、形状は塊状を呈した。カルスはその後、成長することなく全てが褐化していった。



第2図 ‘青島温州’の胚乳カルス形成に対するCH濃度の影響 (2,4-D-2.0mg/l,BA5.0mg/lの添加培地)

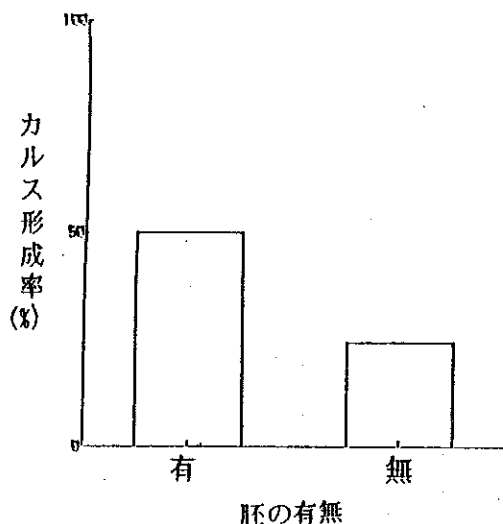
第2表 胚乳カルス誘導培地が‘青島温州’の胚に及ぼす影響

胚の生育 ステージ	カルス形成率	未分化率
	%	%
球 状	4.4	88.5
心 臓	1.9	92.5
魚 雷	2.3	95.4
子 葉*	4.8	89.2

*胚及び子葉

② カルス形成に対する胚の影響

第3図に胚の有無とカルス形成について示した。胚乳内の胚を除去せずそのまま培養した方が、明らかに除去したものよりカルス形成率は高く、約2倍となった。



第3図 '青島温州'の胚乳カルス形成に対する胚の影響

(3) カルス再分化培地の検討

カルスの再分化について、検討した結果を第3表に示した。GA₃ 0、1 mg/lでは反応がなく、3 mg/l以上で反応し、10 mg/lが最も高い形成率を示した。形成されたのは胚様体に似た小さなものであり、その後、植物化のための生長調整物質等を検討したが、それ以上生育することはなかった。

第3表 GA₃濃度が'青島温州'胚乳カルスの胚様体形成に及ぼす影響

GA ₃ 濃度 (mg/l)	胚様体形成率 (%)
0	0
1	0
3	5.0
5	5.0
10	10.0

2) 薬培養

(1) 培養方法の検討

① 生長調整物質の影響

IAA及びカイネチンを組み合わせ検討した結果を第4図に示した。反応があったのは2種の培地と少なく、IAA 0.02 mg/l単用でカルス、IAA 0.2 mg/l+カイネチン 0.02 mg/lの併用で胚様体を低率で形成した。胚様体は薬裂開部より露出し、同一薬にカルスを形成することはなかった。

第4表にGA₃を検討した結果を示した。GA₃単用で

は胚様体の形成はなかったが、IAA+カイネチンにGA₃を併用するとIAA+カイネチン以上の胚様体形成率を示した。

第4表 '不知火'の薬培養におけるGA₃の影響

生長調整物質 (mg/l)			置床	胚様体	カルス
IAA	カイネチン	GA ₃	薬数	形成率	形成率
			(個)	(%)	(%)
0.02	0.2	0	1046	0.10	0
0	0	1	1008	0	0
0.02	0.2	1	832	0.36	0

② 胚様体形成に及ぼすGA₃の影響

第5図にGA₃の影響について示した。培養3ヶ月後に胚様体形成があったのは培養当初よりGA₃を添加したtr 1のみであった。その後4ヶ月後にはtr 1の胚様体形成率は高くなっていったほか、新たに、培養開始40日後にGA₃及びtr 1に移植したtr 7、8に胚様体形成があった。しかし、当初よりIAA及びカイネチンで培養した培地や、培養開始20日後に移植した処理では胚様体を形成することはなかった。

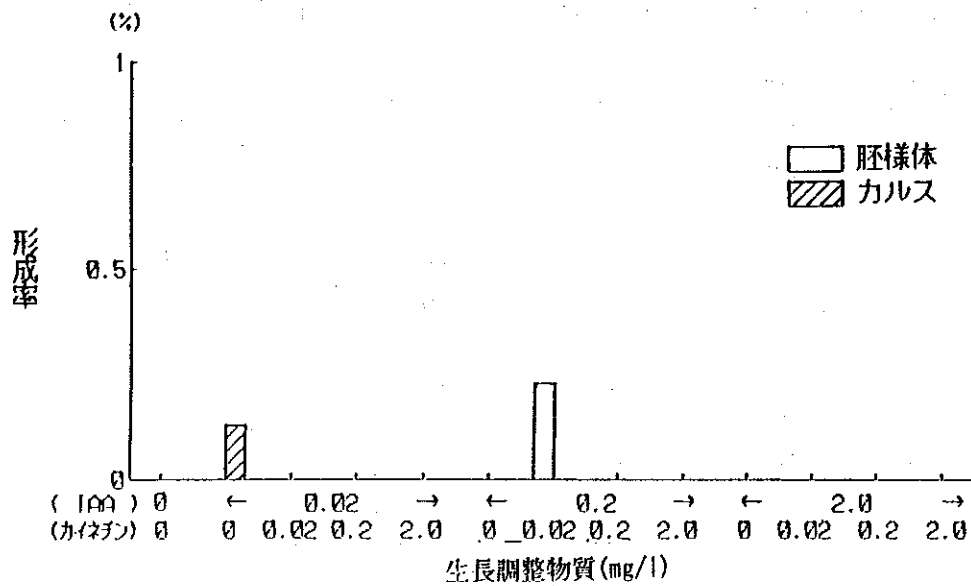
③ スクロース濃度及び糖種類の影響

スクロース濃度について第5表に示した。胚様体は0.03モルをのぞき形成がみられ、0.09、0.15モルで高くなった。カルスは0.15、0.20モルにみられ、高濃度の0.25モルでは胚様体形成率は低く、カルス形成もなかった。

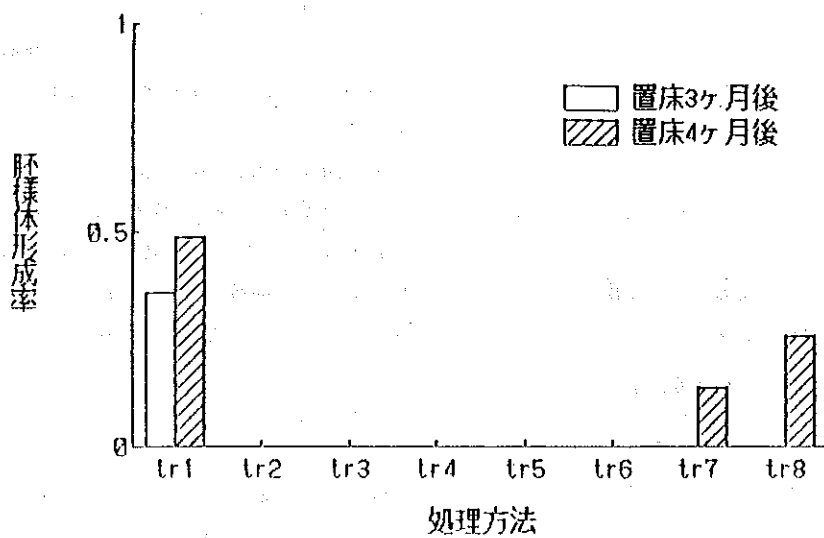
第6表に糖種類の影響について示した。フルクトース、ソルビトールをのぞき胚様体形成があった。胚様体形成率が比較的高かったのはガラクトース、ラクトースであり、ともにスクロースより高い形成率を示した。

第5表 '不知火'の薬培養におけるスクロース濃度の影響

スクロース濃度 (mol/l)	置床薬数	胚様体形成率 (%)	カルス形成率 (%)
	(個)	(%)	(%)
0.03	957	0	0
0.09	954	0.42	0
0.15	1063	0.47	0.19
0.20	992	0.20	0.30
0.25	999	0.10	0



第4図 '不知火' の薬培養における生長調整物質の影響

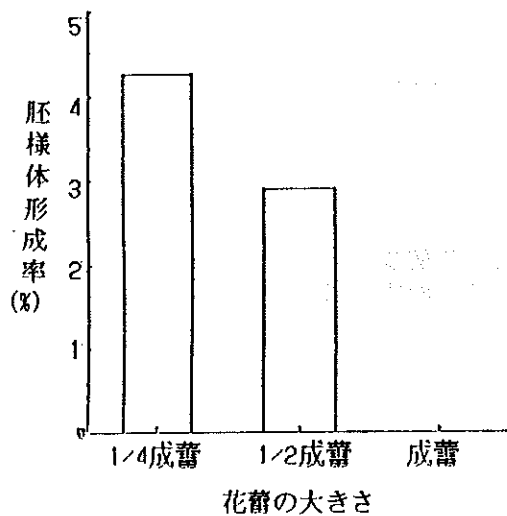


第5図 '不知火' における薬の移植が胚様体形成に及ぼす影響

- tr1 : IAA0.2mg/l+カインチン0.2mg/l+GA1.0mg/lで培養
- tr2 : IAA0.2mg/l+カインチン0.2mg/lで培養
- tr3 : IAA0.2mg/l+カインチン0.2mg/lで20日間培養後、同一培地へ移植
- tr4 : IAA0.2mg/l+カインチン0.2mg/lで20日間培養後、tr1へ移植
- tr5 : IAA0.2mg/l+カインチン0.2mg/lで20日間培養後、GA1.0mg/lへ移植
- tr6 : IAA0.2mg/l+カインチン0.2mg/lで40日間培養後、同一培地へ移植
- tr7 : IAA0.2mg/l+カインチン0.2mg/lで40日間培養後、tr1へ移植
- tr8 : IAA0.2mg/l+カインチン0.2mg/lで40日間培養後、GA1.0mg/lへ移植

第6表 ‘不知火’の薬培養における糖種類の影響

糖の種類 (0.2ml/l)	置床 薬数 (個)	胚様体 形成率 (%)	カルス 形成率 (%)
グルコース	713	0.28	0
ガラクトース	760	0.57	0
フルクトース	516	0	0
ソルビトール	652	0	0
スクロース	654	0.31	0
ラクトース	709	0.56	0
マルトース	903	0.11	0



第6図 ‘不知火’の薬培養における花蕾の大きさの影響
1/4花蕾：成蕾の1/4の大きさ
1/2花蕾：成蕾の1/2の大きさ

④ 花蕾大きさの検討

第6図に花蕾の大きさについての結果を示した。成蕾では反応しなかったが、生育ステージの若い花粉を含む成蕾の1/4及び1/2の大きさの花蕾では胚様体を形成した。形成率は1核期の花粉を含むとみられる1/2の大きさに比べ、4分子期～1核期初期の花粉を含む1/4の大きさが高かった。

(2) 薬培養における品種間差

品種ごとの薬培養の結果を第7表に示した。胚様体を形成したのは、‘不知火’の花粉親である‘中野3号ポンカン’と‘不知火’と同一交配組み合わせの‘陽香’の2品種であった。‘不知火’の種子親である‘清見’の交雑種3系統及び‘今村温州’を種子親に‘中野3号ポンカン’を花粉親とする‘早香’では胚様体を形成することはなかった。

第7表 薬培養における胚様体及びカルス形成の品種間差異

品 種	置床 薬数 (個)	胚様体 形成率 (%)	カルス 形成率 (%)
太田ポンカン	306	0	0
中野3号ポンカン	716	0.42	0
早香	478	0	0
陽香	198	0.50	0
清見×ミネオラ	124	0	0
清見×フェアチャイルド	401	0	0
清見×福原オレンジ	539	0	0

(3) 薬培養により得られた植物体の形質

薬培養によって得られた植物体は全て2倍体であり、アイソザイム結果を第8図に示した。薬培養植物体は‘清見’と‘中野3号ポンカン’の両方のバンドを示し、‘不知火’及び不知火珠心胚実生と同一のパターンとなった。

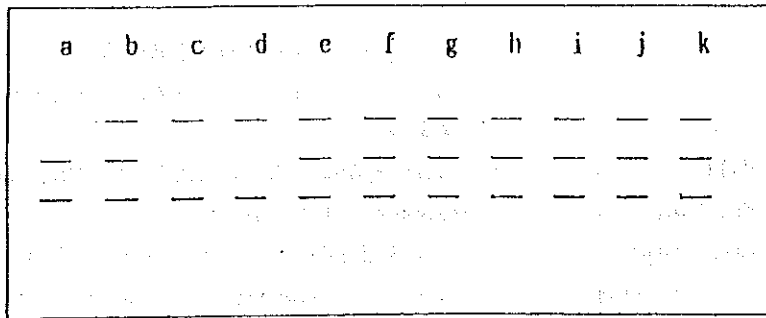
第9図及び第10図に枝梢、葉の形態を示したが、枝梢は生育の差がみられ、生育の鈍いものから良好なものまで幅がみられた。葉は葉形指数60前後のものが最も多かったが、50前後のものもあった。その内の1個体は柳葉で小さく、生育も極めて鈍かった。

2. 考 察

著者らは今回の胚乳培養で、ウンシュウミカンの一つである。‘青島温州’を材料とし、カルス誘導及び胚様体形成をみる事ができた。

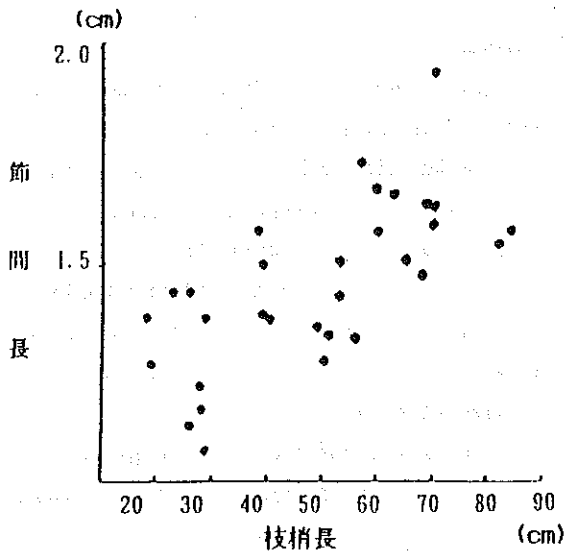
カルス誘導では、ブントアン及びオレンジ (Wang et al, 1978) で使用された2・4-D 2.0mg/l、BA 5.0mg/l、CH 1000mg/lを組み合わせた生長調整物質が最も効果的であった。ただ、CHについてはそれ単独でも効果があり、2・4-D、BAとの併用により相乗的に働くと考えられ、また濃度についても500mg/lでも十分効果があるという結果を得た。

培養にあたり胚乳より胚を除くことに関しては意見が分かれる。Srivastava (1973) はカルス誘導及び再分化には胚の存在が不可欠であるとし、‘embryo factors’が働くこと指摘している。一方、必要としない (Mu et al a, b, 1977; Wang et al, 1978) とするものなかでWangらは、高濃度のジベレリンによりカルスの再分化が可能であったことから、‘embryo factors’をジベレリンと指摘している。著者らの試験は両意見を指示す

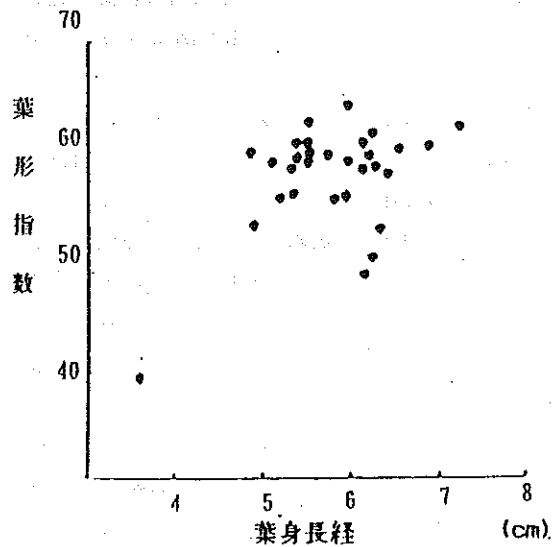


- a : 清水
- b : 不知火
- c : 中野3号ポンカン
- d : 吉田ポンカン
- e : 早香
- f : 不知火珠心胚実生
- g ~ k : 不知火の薬培養植物体

第7図 '不知火'の薬培養植物体のアイソザイム (パーオキシダーゼ) パターン



第8図 '不知火'の薬培養植物体の枝梢の形態



第9図 '不知火'の薬培養植物体の葉の形態

る結果となり、カルス誘導で胚の存在は促進的に働き、高濃度のジベレリンによりカルスの再分化が行われた。ただ、カルス誘導に対するジベレリンの影響が検討されていないこと、また胚乳から直接に胚様体を得られていないことから、ジベレリンについては今後さらに検討する必要がある。

薬培養は、カラタチ (Hidaka et al., 1979)、サワーオレンジ (Hidaka et al., 1982)、トロピタオレンジ (Hidaka, 1984) やシキキツ (凌ら, 1985) 等で報告され、品種により最適濃度はことなるが、いずれも生長調整物質として IAA とカイネチンの併用が有効で、今回材料とした '不知火' では、IAA 0.2mg/l 及びカイネチン 0.02mg/l の併用により胚様体が形成された。ただ、形成率はかなり低く、また供試した培地数に対し、反応

した培地数はかなり少なかった。そこで、胚様体形成を高めるための生長調整物質を検討し、IAA、カイネチンのほかにジベレリンを更に加えることが効果的であるという結果を得た。ジベレリンについて、ニンジンでは体細胞胚の分化に抑制的に働くとし (Halperin, 1971)、カンキツでは珠心カルスの増殖と胚様体形成には阻害的である (Kochba and Spiegel-Roy, 1977) という報告と、胚乳カルスからの胚様体分化と生育では有効である (Wang and Chang, 1978) という報告があり、外植片の種類により誘導されたカルスの反応が異なっている。また、一般に外植片の培養初期からジベレリンが使用される例は少ない。今回の試験では、培養初期より胚様体形成にジベレリンが強い影響を及ぼし、また、胚様体が薬内で確認できる培養40日後 (日高ら,

1988) から再び効果が現れている。このことから、ジベレリンは胚様体形成を誘起するとともに、その後の生育に対して有効に働いていると考えられる。

糖の種類はスクロース以上にガラクトース、ラクトースが有効であり、カラタチと同様な結果であった(陳ら, 1988)。ガラクトース、ラクトースの有効性については珠心カルスからの胚様体形成にも有効に働くことが報告されていることから(Kochba et al., 1978, 1982; 小林ら, 1982; Hidaka and Oomura, 1989)、カンキツには有効な糖類と考えられる。

カンキツでは1つの葯に様々な生育ステージの花粉が含まれているが、イネ(Niizeki and Oono, 1968)やタバコ(Nakata and Tanaka, 1968)など多くの植物と同様に4分子から1核期が適しているとされている。今回の試験では、同一の花粉ステージを含む花蕾が適していたことから、花の大きさからも判断できることが解った。

‘不知火’は‘清見’を種子親とし、‘中野3号ボンカン’を花粉親とした交雑種である。このため、関連する品種について葯培養を検討したが、‘中野3号ボンカン’と‘不知火’と同一交配親の‘陽香’で胚様体形成があった。‘中野3号ボンカン’を種子親としない‘清見’の交雑種には反応がなかったことから、‘不知火’の胚様体形成能力は、‘中野3号ボンカン’より受け継いだものと考えられた。

葯培養によって得られた植物体は、カラタチ(Hidaka et al., 1979)では半数体の他、高半数体、2倍体、混倍数体を得られ、その倍数性については栄養核と生殖核が各々あるいは相互に核融合するためであると示唆し、また、葯壁はカルス化しても胚様体の形成はしないとしている(日高ら, 1988)。今回材料とした‘不知火’は2倍体のみ得られたが、胚様体形成の葯にはカルスを形成することはなく、直接葯外に露出してきた。また、植物体の枝梢及び葉の形質には個体間に違いがみられた。ただ、アイソザイム分析では本来の‘不知火’と同一のパターンを示すことから、今回得られた植物体は葯壁由来の可能性が考えられ、今後更に検討する必要がある。

今回の試験では新しい育種技術として、胚乳及び葯培養の可能性を検討し、‘青島温州’の胚乳培養では有効なカルス誘導法と再分化について一部解明された。また‘不知火’の葯培養ではジベレリンの有効性や遺伝性が明かとなり、由来組織は不明であったが植物体の変異性が確認された。今後更に検討を加えることにより、倍数性育種や交雑育種等に有効な技術として両培養法が利用できると思われる。

IV 摘要

1. 胚乳培養

‘バンペイユ’を材料に胚乳培養の時期について、また‘青島温州’を材料にカルス誘導、再分化を検討し以下の結果を得た。

- 1) 培養の時期は、胚乳が乳褐色で内容物が漏出しないう授粉後80日目頃が良かった。
- 2) カルス誘導には、2・4-D、BA、CHを各々2.0、5.0、1000mg/lの併用が良く、CHについては500mg/lでも同等の効果があつた。
- 3) 胚乳内の胚を除去せず培養すると、除去した場合に比べカルス形成率は高くなった。
- 4) カルスからの胚様体形成はGA₃が有効で、低濃度では形成率は低く、10mg/lで高くなった。

2. 葯培養

‘不知火’を材料に培養の方法、品種間差及び獲得した植物体の形質を調査し、以下の結果を得た。

- 1) 生長調整物質ではIAA、カイネチンの他に、GA₃を併用することで胚様体の形成率は向上し、GA₃は培養初期より効果的に働いていた。
- 2) スクロース濃度では0.09及び0.15モルで胚様体形成率が高く、高濃度でカルス化しやすい傾向にあった。糖種類ではガラクトース、ラクトースがスクロース以上に効果的であった。
- 3) 培養に適する花蕾の大きさは、成蕾の1/4~1/2の大きさがよく、成蕾では胚様体、カルスとも形成しなかった。
- 4) ‘不知火’に関連する6系統を培養した結果、同一交配組み合わせの‘陽香’及び花粉親である‘中野3号ボンカン’で胚様体形成があった。
- 5) 獲得した植物体は全て2倍体であり、アイソザイムパターンは本来の‘不知火’と同一であったが、枝梢及び葉の形態に個体間差があった。

謝 辞

本研究をまとめるにあたり、適切なご指導をいただいた農学博士の河瀬憲次先生に心から御礼を申し上げます。また、調査に協力くださった熊本県農業研究センター果樹研究所常緑果樹部の諸氏に深く感謝いたします。

引用文献

- 1) Halperin, W. (1971). Embryos from somatic plan cell. in Control Mechanisms in the Expression of Cellular Phenotypes, 169-191.
- 2) Hidaka, T., Yamada, Y. and Shichijo, T. (1979).

- In vitro differentiation of haploid plants by anther culture in *Poncirus trifoliata* (L.) RAF. Japan. J. Breeding. 29, 248-254.
- 3) Hidaka, T., Yamada, Y. and Shichijo, T. (1982). Plantlet formation by anther culture of *Citrus aurantium* L. Japan. J. Breeding. 32, 247-252.
- 4) Hidaka, T. (1984). Induction of plantlet from anthers of 'trobita' orange (*Citrus sinensis* Osbeck). J. Japan. Soc. Hort. Sci. 53(1), 1-5.
- 5) 日高哲志・大村三男 (1988). カンキツ葯培養における花粉胚様体の発生過程. 園芸学会昭和63年度秋季大会発表要旨, 18-19.
- 6) Hidaka, T. and Omura, M. (1989). Control of embryogenesis in citrus cell culture, Regeneration from protoplast and attempts to callus bank. Bull. Fruit Tree Res. Stn. B 16, 1-17.
- 7) Hirai, M. and Kajiura, I. (1987). Genetic analysis of leafisozymes in citrus. Japan. J. Breeding. 37, 377-388.
- 8) 小林省蔵・池田勇・中谷宗一 (1982). オレンジ胚珠からの珠心カールの誘導と再分化植物体の均一性について. 果試報E, 43-54.
- 9) Kochba, J. and Spiegel-Roy, P. (1977). The effects of auxins, cytokinins and inhibitors on embryogenesis in habituated ovular callus of the 'shamouti' orange (*Citrus sinensis*). Z. Pflanzenphysiol. 81, 283-288.
- 10) Kochba, J., Spiegel-Roy, P., Neumann, H. and Saad, S. (1978). Stimulation of embryogenesis in citrus tissue culture by galactose. Naturwissenschaften 65, 261-262.
- 11) Kochba, J., Spiegel-Roy, P., Neumann, H. and Saad, S. (1982). Effect of carbohydrates on somatic embryogenesis in subcultured nucellar callus of citrus cultivars. Z. Pflanzenphysiol. 105, 359-368.
- 12) Mu. S. K., et al, (1977)^a. Induction of callus in vitis endosperm cultured in vitro. Acta Botanica Sinica. 19, 93-94.
- 13) Mu. S. K., et al, (1977)^b. Induction of callus from apple endosperm and differentiation of the endosperm plantlet. Scientia Sinica. 20, 355-359.
- 14) Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15, 473-497.
- 15) Murashige, T. and Tucker, P. H. (1969). Growth factor requirements of citrus tissue culture. In. Proc. First Int. Citrus Symp. (ed. Chapman, H. D.) 3, 1155-1161 Riverside. Univ. Calif.
- 16) Nakata, K. and Tanaka, M. (1968). Differentiation of embryoids from developing germ cells in anther culture of tobacco. Japan. J. Genetics 43, 65-71.
- 17) Niizeki, H. and Oono, K. (1968). Induction of haploid rice plant from anther culture. Proc. Japan Acad. 44, 554-557.
- 18) 生山巖 (1981). カンキツ類の根端細胞における染色体の一観察法について. 果試報D 3, 1-8.
- 19) 凌経天・岩政正男・仁藤伸昌 (1985). シキツのやぐ培養における植物体の分化. 園芸学会昭和60年度秋季大会発表要旨, 62-63.
- 20) Srivastava, P. S. (1973). Formation of triploid plantlet in endosperm culture of *Putranjiva roxburghii*. Z. Pflanzenphysiol. 69, 270-273.
- 21) 陳力耕・日高哲志・大村三男 (1988). カラタチの葯培養における系統間差及び培地の影響. 園芸学会昭和63年度秋季大会発表要旨, 16-17.
- 22) Wang, T., and Chang, C. (1978). Triploid citrus plantlet from endosperm culture. Scientia Sinica. 21, 823-827.

Summary

1. Endosperm culture

The suitable time of 'Banpeiyu' (*Citrus grandis* Osbeck) for endosperm culture and the culture conditions of 'Aosima unshiu' (*Citrus unshiu* Marc.) for callus induction and regeneration were studied.

The results obtained are as follows:

- 1) The most suitable time for endosperms culture was 80 days after pollination when the endosperms were slightly hard and milky brown color.
- 2) The endosperms produced white callus on Murashige and Tucker (1969) medium supplemented with 2 mg/l 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), 5 mg/l BA (6-benzylaminopurine) and 500 or 1000 mg/l CH (casein hydrolysate).
- 3) The endosperms produced much callus if they attached with embryos.
- 4) The rate of embryoids production increased depending on GA₃ (gibberellin A3).

2. Anther culture

For obtain haploid plant, anther culture of 'Shiranuhi' ('Kiyomi' tangor (*C. unshiu* x *C. sinensis*) x 'Nakano No.3 ponkan' (*Citrus reticulata* Blanco)) were studied.

The results obtained are as follows:

- 1) Embryoids were produced from anthers cultured on Murashige and Skoog (1962) medium supplemented with 0.2 mg/l IAA (indole-3-acetic acid) and 0.02 mg/l kinetin. Addition of 1.0 mg/l GA₃ enhanced embryoid formation.
- 2) The sucrose concentrations adequate for embryoid production were 0.09 - 0.15M. The callus formation was enhanced with increasing of sucrose concentration. Galactose and lactose were better than sucrose.
- 3) The anther of about one-third size of flower compared with flowering time efficiently produced embryoids. The anthers at flowering time produced no embryoids and callus.
- 4) The anther of 'Nakano No.3 ponkan', the pollen parent of 'Shiranuhi', and 'Youkou', the same cross combination of 'Shiranuhi', both formed the embryoids.
- 5) Leaf shape, the chromosome number, and isozyme banding pattern of peroxidase were examined in 31 plants regenerated from the anther culture of 'Shiranuhi'. All plants were diploids. No variation in isozyme banding pattern of peroxidase were observed among the regenerated plants and 'Shiranuhi'. The difference in the leaf and shoot shape observed among them.