

ヒュウガナツ(*Citrus tamurana hort.ex Tanaka*)における成熟花粉の液体培養系の確立

誌名	園芸学研究
ISSN	13472658
著者	内田, 飛香 安部, 秋晴 星野, 洋一郎 國武, 久登
巻/号	11巻2号
掲載ページ	p. 173-179
発行年月	2012年4月

ヒュウガナツ (*Citrus tamurana hort. ex Tanaka*) における 成熟花粉の液体培養系の確立

内田飛香¹・安部秋晴²・星野洋一郎³・國武久登^{2*}

¹宮崎大学大学院農学工学総合研究科 889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西

²宮崎大学農学部 889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西

³北海道大学 北方生物圏フィールド科学センター 060-0811 北海道札幌市北区北11条西

Liquid Culture System for Mature Pollen in Hyuganatsu (*Citrus tamurana hort. ex Tanaka*)

Asuka Uchida¹, Akiha Abe², Yoichiro Hoshino³ and Hisato Kunitake^{2*}

¹The Interdisciplinary Graduate School of Agriculture and Engineering, University of Miyazaki, Miyazaki 889-2192

²Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, Miyazaki 889-2192

³Field Science Center for Northern Biosphere, Hokkaido University, Sapporo 060-0811

Abstract

In order to establish an *in vitro* culture model for male self-compatibility and -incompatibility in *Citrus*, we assessed the culture environmental condition and optimal constitution of the liquid culture medium using mature pollen of Hyuganatsu (*Citrus tamurana hort. ex Tanaka*). A basal medium (Hirano • Hoshino, 2009) was used for examination of the optimum constitution. Mature pollen was cultured in a modified medium containing 0.04% (w/v) CaCl₂, 0.01% (w/v) H₃BO₃, 0.0007% (w/v) KH₂PO₄, 0.02% (w/v) yeast extract and 10% (w/v) sucrose with the pH adjusted to 7.0, at a density of 1 × 10⁵ pollen grains • mL⁻¹. These were kept at 25°C under dark conditions. In particular, the addition of CaCl₂, yeast extract and sucrose to the culture medium was essential for an efficient liquid culture system of mature pollen. In this culture, the normal germination of pollen grains occurred after 4 hours, and the pollen tubes extended approximately 20 μm per hour. The normal germination rate of mature pollen was highest (73.6%) after 6 hours of culture. Good growth of pollen tubes was maintained, and they reached 200 μm in length after 8 hours of culture.

Key Words : calcium chloride, liquid culture, pollen tube, self-incompatibility, yeast extract

キーワード : 液体培養, 塩化カルシウム, 自家不和合性, 花粉管, 酵母エキス

緒言

カンキツ類では、多くの品種において自家不和合性が報告されており (Soost, 1965; Yamamoto ら, 2006; Yamashita, 1978), 配偶体型自家不和合性であることを裏付ける様々な報告がなされている (de Nettancourt, 1977; Soost, 1965; Ueno, 1978; Yamashita, 1980, 1981). カンキツ類と同じく配偶体型自家不和合性を示すバラ科果樹においては、本現象が *S* 遺伝子にコードされ、花柱特異的に発現するリボヌクレアーゼ (*S-RNase*) と、*S-RNase* 遺伝子の近傍に位置して密接に連鎖している *SFB* 遺伝子の転写産物で、花粉特異的に発現する *F-box* タンパク質により制御されることが明らかとなっている (Sassa ら, 1996; Ushijima ら, 2003; Yamane ら, 2003).

一方、カンキツ類においては、本現象が2つの *S* 対立遺伝子に制御されているという報告があり (Ngo ら, 2001; Soost, 1969), その *S* 因子の推定が行われている (Kim ら, 2010; Ngo ら, 2010, 2011). さらに筆者らは、これまでに自家不和合性を有するヒュウガナツ (*Citrus tamurana hort. ex Tanaka*) の花蕾を用いて、プロテオーム解析により花柱タンパク質のプロファイリングを行い、成熟に伴い発現量に変化するタンパク質を明らかにした (内田ら, 2009). また最近、ブンタン (*C. grandis* Osbeck) ‘沙田柚’ とポンカン (*C. reticulata* Blanco) ‘沙糖橘’ の雌ずいにおいて、それぞれ既報の *S-RNase* 遺伝子と相同性のある *S-RNase* 様遺伝子が単離されたが (Chai ら, 2011b; Miao ら, 2011), それらの転写産物の発現部位や機能はバラ科で報告されている *S-RNase* とは異なっており、カンキツ類の不和合反応とこれらの遺伝子との関連は不明である。以上のように、カンキツ類の自家不和合性についてはいまだ原因物質の同定に至っていない。

バラ科の自家不和合性における雄性側遺伝子 *SFB* は、

2011年6月7日 受付. 2011年10月13日 受理.

本研究は、文部科学省女性研究者支援モデル育成事業「逆風を順風に 宮崎大学女性研究者支援モデル」において行われた。

* Corresponding author. E-mail: hkuni@cc.miyazaki-u.ac.jp

アーモンド (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb.) (Ushijima ら, 2003) や甘果オウトウ (*P. avium* (L.) L.) (Ushijima ら, 2004), ウメ (*P. mume* Siebold & Zucc.) (Ushijima ら, 2003; Yamane ら, 2003) において, *S-RNase* 遺伝子周辺のクロモゾームウォーキングやショットガンシークエンスによるゲノム構造解析により単離された. 自家不和合性に関連する遺伝的情報に乏しいカンキツ類においては, これらの手法による原因遺伝子の探索は困難である. そこで, 自家不和合性反応をリアルタイムで捉え, 実際に反応が生じている器官の採取が可能となれば, 自家不和合性関連因子の探索に非常に有益であると推測される. しかしながら, 花柱の通導組織や子房の中にある花粉管を大量に採取することは困難である. そこで, 花粉管の動きを視覚化でき, 大量の花粉管を採取できる *in vitro* の液体花粉培養系の確立が望まれている.

成熟花粉の液体培養は, ニホンナシ (*Pyrus pyrifolia* (Burm. f.) Nakai) (Hiratsuka ら, 2001; Zhang・Hiratsuka, 2005), ペチュニア (*Petunia inflata* R. E. Fr.) (Holden ら, 2003), テッポウユリ (*Lilium davidii* Duch.) (Li ら, 2001) およびアルストロメリア (*Alstroemeria aurea* Graham) (Hirano・Hoshino, 2009) において報告されている. Liu ら (2007) はナシの液体花粉培養系を利用し, 自己花柱から抽出した *S-RNase* が, *in vitro* において *in vivo* で生じる自家不和合反応と同様に, 自己花粉管のアクチン繊維の重合を阻害し, 花粉管伸長を停止することを確認している.

カンキツ類においては, 三輪 (1951) が発芽床 (寒天培地) を用いて, その組成や培養時間と発芽稔性との関係を明らかにしている. また, クロコウジカビ (*Aspergillus niger* van Tieghem) 由来の *RNase* 添加 (Roiz ら, 2000) や硫酸銅添加 (Mesejo ら, 2007) による花粉管伸長抑制作用についても, 同様の発芽床を用いた報告例がある. しかしながら, カンキツ類において液体培養系を用いた成熟花粉培養の例は, 我々の知る限り報告されていない.

そこで本研究では, カンキツ類における雄性側自家不和合性に関するモデル系を確立するために, ヒュウガナツ成熟花粉を用いて培養条件や培地組成を検討することにより, 成熟花粉の液体培養系の確立について検討を行った.

材料および方法

1. 供試材料

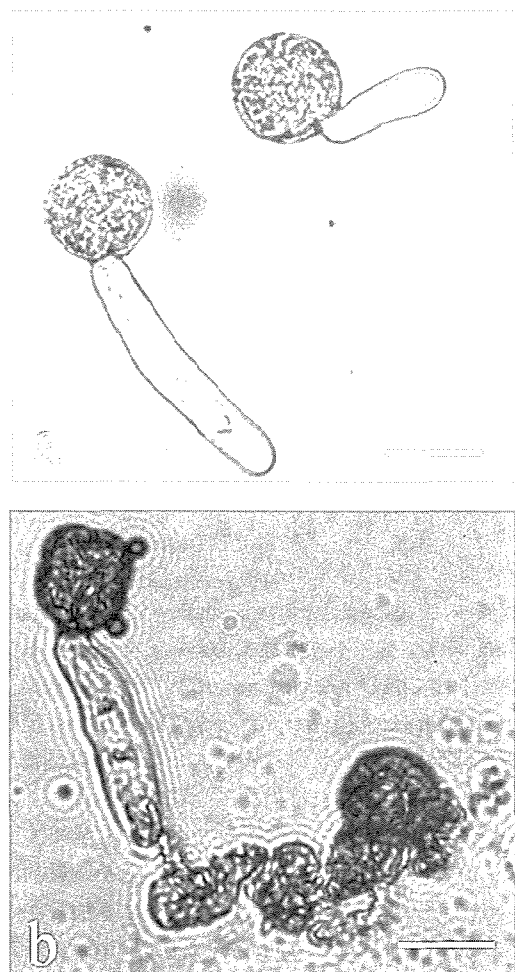
植物材料として, 宮崎県総合農業試験場亜熱帯作物支場のカンキツ園にて栽培されているヒュウガナツ (*C. tamarana* hort. ex Tanaka) 普通系の花蕾を, 2009年と2010年の4月下旬に採取し, 以後の実験に用いた. これらの開花直前の花蕾より摘出した葯を常法にて開葯し, 実験に供試するまで -40°C 条件下にて保存した.

2. 花粉発芽と花粉管破裂に及ぼす培養時間の影響

保存していた葯を基本培地中で, ピンセットで葯を潰して花粉を取り出した. 基本培地は, アルストロメリア (*A.*

aurea Graham) の成熟花粉培養のために考案された培地 (Hirano・Hoshino, 2009) を基準とし, 0.01% (w/v) 塩化カルシウム, 0.01% (w/v) ホウ酸, 0.0007% (w/v) リン酸二水素カリウム, 10% (w/v) ショ糖および 0.01% (w/v) 酵母エキスを添加し, pH を 5.8 に調整後, オートクレーブにて 121°C , 15 分間滅菌したものを使用した. 花粉の培養密度は, 血球計算板にて 1×10^5 個 $\cdot \text{mL}^{-1}$ になるように調整し, 滅菌シャーレ (Easy Grip™ Tissue Culture Dish, 35×10 mm, Falcon3001) にて 25°C , 暗黒条件下で培養を行った.

正常花粉発芽や花粉管破裂の観察は倒立顕微鏡 (DIAPHOT, Nikon) で行い, 花粉管長は播種後 1 時間おきにマイクロメーターを用いて測定した. $30 \mu\text{m}$ 以上花粉管が正常に伸長したものを正常発芽花粉とみなし, 伸長した花粉管が破裂したものを花粉管破裂とみなした (第 1 図). この際, 1 視野当たり約 25 個の花粉を無作為に観察し, 花粉管が破裂せずに発芽している花粉の割合を正常発芽花粉率, 発芽花粉管が破裂した花粉の割合を花粉管破裂率として算出し



第 1 図 ヒュウガナツ成熟花粉の液体培養における正常発芽花粉および花粉管破裂
a: 発芽花粉 (花粉管が $30 \mu\text{m}$ 以上伸長したものを正常発芽花粉とした)
b: 花粉管破裂 bars = $30 \mu\text{m}$

た。なお、1シャーレ当たり10視野の測定を、1処理区当たり3反復(シャーレ)行った。

3. 花粉発芽と花粉管破裂に及ぼす培養温度、培養密度およびpHの影響

培養温度、培養密度およびpHの最適条件の検討を行った。培養温度は、pH 5.8に調整した基本培地にて、花粉を 1×10^5 個 \cdot mL $^{-1}$ の密度で播種後、15、20、25、30および35 $^{\circ}$ Cにて培養を行った。次に、基本培地のpHは、pH 4、5、6、7、8および9に調整した培地に花粉を 1×10^5 個 \cdot mL $^{-1}$ の密度で播種後、培養を行った。さらに、培養密度は、pH 5.8に調整した基本培地にて、花粉を 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 および 1×10^6 個 \cdot mL $^{-1}$ の密度で播種後、培養を行った。すべての培養は25 $^{\circ}$ C、暗黒条件下で行い、播種6時間後に前述した方法にて正常発芽花粉率および花粉管破裂率を調査した。

4. 花粉発芽と花粉管破裂に及ぼす培地組成の影響

前述した基本培地(Hirano・Hoshino, 2009)を基準として、ヒュウガナツの成熟花粉の培養方法を確立するために、シヨ糖濃度、酵母エキス濃度および塩化カルシウム濃度の検討を行った。検討項目以外の組成は基本培地と同一とした。シヨ糖濃度は2.5、5、10、20および40% (w/v)の5水準、酵母エキス濃度は、0.0025、0.005、0.01、0.02および0.04% (w/v)の5水準、塩化カルシウム濃度は0.0025、0.005、0.01、0.02、0.04、0.08および0.16% (w/v)の7水準とした。すべての培養は25 $^{\circ}$ C、暗黒条件下にて行い、播種6時間後に前述した方法にて正常発芽花粉率および花粉管破裂率を調査した。

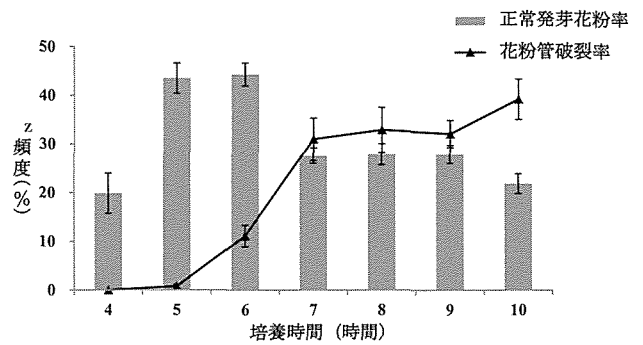
5. 液体花粉培養系の評価

確立した液体花粉培養の最適条件を用いて実際に培養を行い、従来から用いられてきた染色稔性や発芽試験による花粉稔性評価法との比較を行った。まず、花粉染色稔性の調査は、スライドガラス上にて1%酢酸カーミンを用いて花粉を染色し、光学顕微鏡下にて観察を行った。次に、*in vitro*における花粉発芽稔性の比較のため、Yahataら(2005)の手法に従い、1%寒天と10%シヨ糖(w/v)(pH未調整)による寒天シヨ糖培地をスライドガラス上に厚さ約2mmで作製し、花粉を適宜播種後25 $^{\circ}$ C、暗黒条件下にて6時間培養を行った。さらに、最適条件にて液体花粉培養を行い、播種6時間後に正常発芽花粉率を調査し、染色稔性や発芽試験による花粉稔性評価法と比較した。

結果および考察

1. 花粉発芽と花粉管破裂に及ぼす培養時間、培養温度、培養密度およびpHの影響

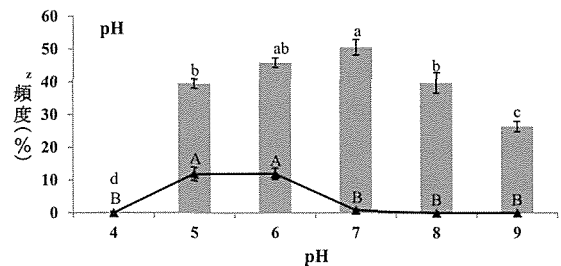
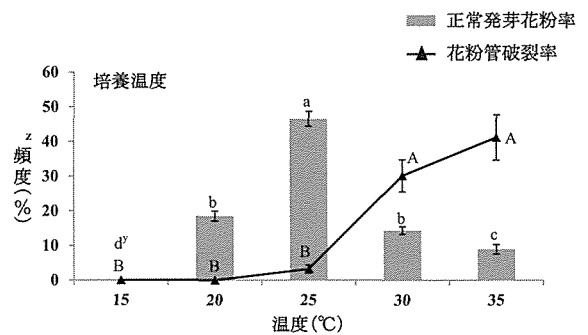
基本培地に成熟花粉を播種後、1時間おきに正常発芽花粉率、花粉管破裂率および花粉管長を調査した(第2図)。培養2時間後、花粉管が花粉から正常に突出するのが観察された。一方、播種直後に破裂する花粉も認められた。培養4時間後には、本実験で定義づけた花粉管長が30 μ mを



第2図 ヒュウガナツ成熟花粉の液体培養における正常発芽花粉率と花粉管破裂率の経時的変化

基本培地(Hirano・Hoshino, 2009)に成熟花粉を播種後、25 $^{\circ}$ C、暗黒条件下で培養を行い、正常発芽花粉率および花粉管破裂率を経時的に調査した

^z1処理区当たり3反復で行った



第3図 ヒュウガナツ成熟花粉の液体培養における正常発芽花粉率と花粉管破裂率に及ぼす培養温度およびpHの影響

^z全処理区において、培養6時間後に正常発芽花粉率と花粉管破裂率を1処理区当たり3反復調査した

^yTukeyの多重比較により、異なる英文字間で5%レベルで有意差があることを示す

超える発芽が確認された。その後も伸長が続き、カロース栓が明瞭に観察された。最終的に正常発芽花粉率は、播種6時間後で最高となった。それ以降は花粉管の破裂が確認され、正常発芽花粉の割合が減少した。それらの花粉管は、その先端や途中が肥大し破裂していた。花粉管の破裂は播種後6時間以降から観察され、その後急激に増加し、7時間後には破裂が正常に伸長している花粉管の頻度を上回った。培養時間と花粉管長の関係について調査した結果、1時

間に約 20 μm の均一な伸びが確認され、8 時間後には破裂花粉が多く観察されたが、200 μm に到達するものもあった。以上の結果より、正常発芽花粉率の調査は播種 6 時間後に行うこととした。

次に、培養温度と pH についての検討を行った (第 3 図)。最適な培養温度について調査したところ、15°C では全く発芽が観察されなかったが、25°C では有意に高い正常発芽花粉率 (46.5%) となった。30°C を越えると花粉管破裂率が増加し、35°C での花粉管破裂率は 41.2% となった。しかしながら、35°C では正常発芽花粉が早い時間から確認され、伸長を続けた花粉管には長いものが多く観察された (データ略)。これらの結果は、ミカン科が元来熱帯性であることに起因していると推察された。そのため 35°C 付近で最も発芽の活性が高く、低温の 15°C では発芽しなかったと考えられる。花粉管が伸長する際には原形質が先端部へ流動し、伸長に伴いセルロースとペクチンからなる花粉管壁が形成される。花粉発芽や花粉管伸長の条件としては適していると考えられる高い温度条件下での花粉は、急激な花粉管伸長に花粉管壁の形成が追いつかず、結果として花粉管破裂率が高くなると考えられた。最適な培地の pH について調査したところ、pH 4 では全く花粉発芽は観察されなかった。pH 5 以上で徐々に発芽率は増加し、pH 6 と 7 で最も高い正常発芽花粉率となった。両者の発芽率に有意な差はなかったものの、pH 7 における花粉管破裂率は 0.8% と、pH 6 での 12% と比較し大幅に減少していたため、pH 7 が液体花粉培養に最適な pH であると推測された。さらに、最適な花粉の培養密度について検討を行った (データ略)。本実験での密度においては、花粉管破裂は全く観察されなかった。正常発芽花粉率は密度が高くなるにつれて上昇し、 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ 個・ mL^{-1} の密度で約 50% の正常発芽花粉率が得られた。しかしながら、 1×10^6 個・ mL^{-1} では凝集する花粉が多く、観察に支障をきたすため、 1×10^5 個・ mL^{-1} が最適な培養密度と考えられた。

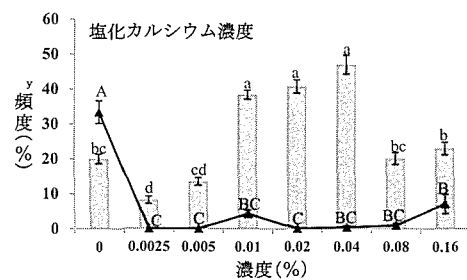
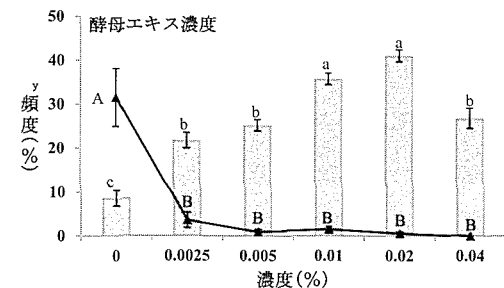
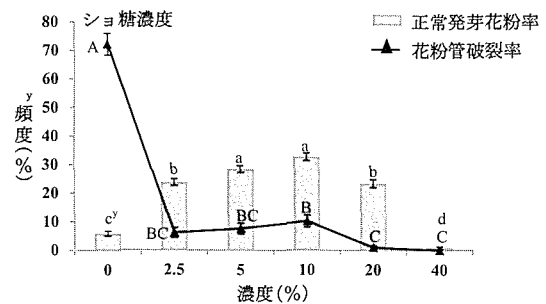
成熟花粉の液体培地においては、タカサゴユリ (*Lilium formosanum* Wallace) (Lovy-Wheeler ら, 2005)、タバコ (*Nicotiana tabacum* L.) (Chen ら, 2002)、ペチュニア (Holden ら, 2003) にて、pH 5.5 ~ 6.0 の酸性~弱酸性領域にて培養が行われている。果樹では、ニホンナシ (Hiratsuka ら, 2001; Liu ら, 2007) において、pH 6.0 ~ 6.5 の弱酸性領域にて培養されている。これまでのカンキツの花粉発芽試験には、通常 Murashige・Skoog (1962) 培地 (pH 5.6 ~ 5.8) (Chai ら, 2011a; Ye ら, 2009) や、寒天・シヨ糖培地 (pH 未調整) (Yahata ら, 2005) が用いられてきた。本実験においては、pH 7 に調整した際に高い正常発芽花粉率と最も低い花粉管破裂率が観察された。そこで、ヒュウガナツ普通系の雌ずいの各部位における pH を簡易的に測定したところ (蕾 10 花分の雌ずいを分解し、各部位ごとに蒸留水 30 mL を加えて乳鉢にて磨砕後、pH メーターにて測定)、柱頭: pH 6.8、花柱: pH 6.7、子房: pH 6.9 とすべて pH 7 に近い

値を示した。これらの結果より、花粉管の伸長に最適な pH は、雌ずい内と同程度の pH であることが推測された。三輪 (1951) は、酸性~アルカリ性まで広範囲の pH において、発芽床におけるヒュウガナツ花粉の発芽能力の調査を行っており、発芽に最適な pH を 6.1 ~ 7.0 と報告している。本実験における結果は三輪の報告と一致していた。

以上より、液体花粉培養のための最適な培養条件は、培養温度 25°C、培養密度 1×10^5 個・ mL^{-1} および培地の pH は 7 とした。

2. 花粉発芽と花粉管破裂に及ぼす培地組成の影響

液体花粉培養における最適培地組成の確立のために、基本培地を元に、シヨ糖、酵母エキスおよび塩化カルシウム濃度の検討を行った (第 4 図)。これらのいずれかの成分を添加しない場合は正常発芽花粉率が低く、または花粉管破裂率が有意に高くなり、基本培地への添加は必須であることが確認された。まず、シヨ糖濃度について検討を行った



第 4 図 ヒュウガナツ成熟花粉の液体培養における正常発芽花粉率と花粉管破裂率に及ぼす基本培地のシヨ糖、酵母エキスおよび塩化カルシウム濃度の影響

² 全処理区において、培養 6 時間後に正常発芽花粉率と花粉管破裂率を調査した

³ 1 処理区当たり 3 反復行い、Tukey の多重比較により異なる英文字間で 5% レベルで有意差があることを示す

ところ、5 および 10%区において約 30%と高い正常発芽花粉率となり、40%ではほとんど発芽は観察されなかった。三輪 (1951) は、ヒュウガナン花粉の発芽床におけるショ糖濃度は、5%が最適であるとしている。ニホンナシ花粉の液体培養においては、10%ショ糖が添加されている (Hiratsuka ら, 2001)。本実験においても 5 および 10%添加区が最も高い正常発芽花粉率となったが、ショ糖が浸透圧調節と以後の花粉管伸長のためのエネルギー源であることをふまえ、本培養系においてはニホンナシと同様のショ糖 10%添加とすることとした。

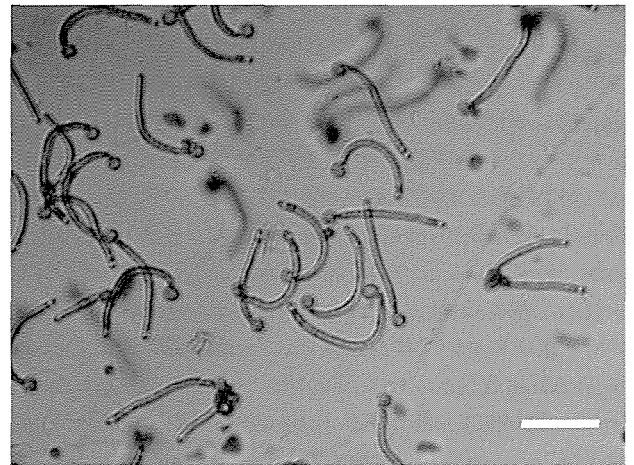
次に酵母エキス濃度について検討を行ったところ、添加濃度が上昇するにつれ、正常発芽花粉率が増加した。0.01 および 0.02%区において最も高い正常発芽花粉率となったが (35.7 ~ 44.1%)、0.4%区においては再び低下した。酵母エキスのような天然有機物質の添加は、他にタバコ (Lush ら, 1998)、ペチュニア (Holden ら, 2003) の液体花粉培養や、コムギ (*Triticum aestivum* L.) (劉ら, 1992) の胚培養において、カゼイン加水分解物添加などの例がある。これらの物質は多くのアミノ酸やビタミン類を含み、一般に培養物の生長促進に寄与することが知られており、本実験においても酵母エキスが同様の働きをしたものと推測された。

塩化カルシウム濃度について検討を行ったところ、0.0025%と 0.005%においては、花粉管長が発芽花粉とみなした 30 μm に到達する前に破裂する花粉が多く、正常発芽花粉率は 20%以下となった。0.01、0.02 および 0.04%において、正常発芽花粉率は約 40%以上と最も高くなった。0.08%以上の濃度となると、他処理区よりも長い花粉管が観察されたものの、再び発芽率は低下した。適切な濃度の外因性カルシウムイオンは花粉管伸長を促進し、高濃度のカルシウムイオンは花粉管伸長を抑制するということが報告されている (Holdaway-Clarke ら, 2003; Malhó・Trewavas, 1996)。Holdaway-Clarke ら (2003) や Shi ら (2009) は、1 mM 程度のカルシウムイオンが花粉発芽率の向上や正常な花粉管伸長に最適であるとしている。本実験においては 0.01、0.02 および 0.04% (w/v) 塩化カルシウム添加区が最も高い正常発芽花粉率を示した。これらはそれぞれ、0.9、1.8 および 3.6 mM に相当し、カンキツの液体花粉培養においても、適度なカルシウムイオン添加が正常発芽花粉率の増加に効果的であることが示唆された。

以上の結果より、液体花粉培地として、ショ糖濃度 10%、酵母エキス濃度 0.02%、および塩化カルシウム濃度 0.04% を用いることとした。

3. 液体花粉培養系の評価

上記検討により決定したカンキツ成熟花粉における液体花粉培養の最適条件は、培養時間 6 時間、培養温度 25°C、播種密度 1×10^5 個 $\cdot \text{mL}^{-1}$ とした。また、最適培地としては、0.04% (w/v) 塩化カルシウム、0.01% (w/v) ホウ酸、0.0007% (w/v) リン酸二水素カリウム、10% (w/v) ショ糖および 0.02% (w/v) 酵母エキス、pH 7 とした。この液



第 5 図 ヒュウガナンにおける最適条件での液体花粉培養倒立顕微鏡下にて培養 6 時間後に観察した bar = 100 μm

体花粉培養系を用いて実際に培養を行い、従来から用いられてきた染色稔性や発芽試験による花粉稔性評価法との比較を行った。1%酢酸カーミンにて染色稔性の調査したところ、97.0%であった。寒天ショ糖培地での正常発芽花粉率は 37.5%、液体花粉培養における正常発芽花粉率は 73.6%であった。本試験で確立した液体花粉培養においては、培養 6 時間後も花粉管の破裂はほとんど観察されなかった (第 5 図)。Hirano・Hoshino (2010) は、アルストロメリアにおいて 36 時間の培養が可能としている。今後、さらに培養環境や培地組成の検討を行い、正常発芽花粉率の向上や花粉管破裂率の低下による培養時間の延長を目指すことが必要である。

これまでに、果樹における自家不和合性の打破を目的として、開花前の花蕾に各種重金属塩の噴霧処理の検討がカンキツ (久保ら, 2009)、ニホンナシ (林田ら, 2009) において行われてきた。硫酸銅や硫酸鉄などの 2 価の金属イオンを処理した場合、程度の違いはあるものの、花粉管の花柱基部までの伸長を促進し、自家不和合性を打破することが確認されている。また、これらの重金属塩を含有するリンゴ (*Malus domestica* Borkh.) の自家不和合性打破剤も開発され (孫ら, 2006)、ニホンナシに処理した際にも、自家受粉後の着果率に影響を与える可能性があることが明らかとなった (平塚ら, 2009)。これらの結果は、これまで *in vivo* での確認しか行えなかったが、本液体花粉培養系を用いることで、*in vitro* での花粉管の挙動の観察が可能となる。また、Liu ら (2007) の報告にあるように、自己花柱抽出物添加による花粉管の自家不和合反応も直接観察することができる。さらに、培地内で伸長した花粉管は容易に回収が可能で、実際に和合・不和合反応を生じた花粉管を、プロテオーム解析をはじめとする分子生物学的解析の材料として供試することが期待できる。

摘 要

カンキツ類における雄性側自家和合・不和合に関する *in vitro* 培養モデル系を確立するために、ヒュウガナツ成熟花粉を用いて培養環境条件や液体培地組成について検討を行った。最適な培養温度について調査したところ、25°Cで最も高い正常発芽花粉率となった。また、最適 pH は 7.0 であり、最も高い正常発芽花粉率と低い花粉管破裂率が観察された。基本培地 (Hirano・Hoshino, 2009) を修正して液体培地組成について検討したところ、最適培地組成は、0.04% (w/v) 塩化カルシウム、0.01% (w/v) ホウ酸、0.0007% (w/v) リン酸二水素カリウム、0.02% (w/v) 酵母エキス、および 10% (w/v) ショ糖となった。ヒュウガナツの液体花粉培養には、酵母エキスや塩化カルシウムの添加が有効であり、浸透圧調節やエネルギー源としてのショ糖の添加も重要であることが明らかとなった。これらの最適培養条件と培地組成において、ヒュウガナツ成熟花粉を 1×10^5 個・mL⁻¹ の密度で播種し、25°C、暗黒条件下で培養を行ったところ、培養 4 時間後に花粉の発芽が確認され、花粉管は 1 時間当たり約 20 μ m ずつ伸長していた。培養 6 時間後、最も高い正常発芽花粉率 73.6% が確認され、さらに培養 8 時間後には花粉管は 200 μ m の長さに到達したのもあった。以上のように、ヒュウガナツの成熟花粉の液体花粉培養系を確立することができた。

謝 辞 本研究で用いた植物材料は、宮崎県総合農業試験場亜熱帯作物支場より提供して頂きました。実験へのご協力およびご指導を賜りました同支場長 黒木重文氏と研究員黒木宏憲氏はじめ、同支場の皆様には、深く感謝の意を表します。

引用文献

- Chai, L., X. Ge, M. K. Biswas, Q. Xu and X. Deng. 2011a. Self-sterility in the mutant 'Zigui shatian' pummelo (*Citrus grandis* Osbeck) is due to abnormal post-zygotic embryo development and not self-incompatibility. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 104: 1–11.
- Chai, L., X. Ge, Q. Xu and X. Deng. 2011b. *CgSL2*, an S-like RNase gene in 'Zigui shatian' pummelo (*Citrus grandis* Osbeck), is involved in ovary senescence. *Mol. Biol. Rep.* 38: 1–8.
- Chen, C. Y., E. I. Wong, L. Vidali, A. Estavillo, P. K. Hepler, H. Wu and A. Y. Cheung. 2002. The regulation of actin organization by actin-depolymerizing factor in elongating pollen tubes. *Plant Cell* 14: 2175–2190.
- de Nettancourt, D. 1977. *Incompatibility in angiosperms.* Springer, New York.
- 林田大志・堀川晃宏・平塚 伸・名田和義. 2009. ニホンナシの自家不和合性に関する研究。(第 54 報) 重金属イオンによる自家不和合性打破. *園学研.* 8 (別 2): 129.
- Hirano, T. and Y. Hoshino. 2009. Detection of changes in the nuclear phase and evaluation of male germ units by flow cytometry during *in vitro* pollen tube growth in *Alstroemeria aurea*. *J. Plant Res.* 122: 225–234.
- Hirano, T. and Y. Hoshino. 2010. Sperm dimorphism in terms of nuclear shape and microtubule accumulation in *Cyrtanthus mackenii*. *Sex. Plant Reprod.* 23: 153–162.
- 平塚 伸・堀川晃宏・名田和義・伊藤 寿・大野秀一・三井友宏・加田 弘. 2009. リンゴの自家不和合性打破剤のニホンナシに対する効果の検証. *園学研.* 8: 469–473.
- Hiratsuka, S., S. L. Zhang, E. Nakagawa and Y. Kawai. 2001. Selective inhibition of the growth of incompatible pollen tubes by S-protein in the Japanese pear. *Sex. Plant Reprod.* 13: 209–215.
- Holdaway-Clarke, T. L., N. M. Weddle, S. Kim, A. Robi, C. Parris, J. G. Kunkel and P. K. Hepler. 2003. Effect of extracellular calcium, pH and borate on growth oscillations in *Lilium formosanum* pollen tubes. *J. Exp. Bot.* 54: 65–72.
- Holden, M. J., J. A. Marty and A. S. Cundy. 2003. Pollination-induced ethylene promotes the early phase of pollen tube growth in *Petunia inflata*. *J. Plant Physiol.* 160: 261–269.
- Kim, J. H., T. Mori, A. Wakana, B. X. Ngo, J. Masuda, K. Sakai and K. Kajiwara. 2010. Production of homozygous S₁ seedlings for S gene in 'Hirado Buntan' pummelo (*Citrus grandis* Osbeck) and determination of the S alleles (S₉ and S₁₀) by pollination with the S₁ seedlings to *Citrus* cultivars. *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.* 55: 239–245.
- 久保達也・前原由美・浜田憲久・川口昭二・野村哲也・福留弘康・勘米良祥多・山本雅史・富永茂人. 2009. 各種金属処理がハッサクの自家不和合性に及ぼす影響. *園学研.* 8 (別 2): 389.
- Li, Y., S. Y. Zee, Y. M. Liu, B. Q. Huang and L. F. Yen. 2001. Circular F-actin bundles and a G-actin gradient in pollen and pollen tubes of *Lilium davidii*. *Planta* 213: 722–730.
- 劉 洪軍・三十尾修司・上島脩志・澤野 稔. 1992. コムギの未熟胚培養におけるカゼイン加水分解物の添加効果. *育学雑.* 42: 367–373.
- Liu, Z., G. Xu and S. L. Zhang. 2007. *Pyrus pyrifolia* stylar S-RNase induces alterations in the actin cytoskeleton in self-pollen and tubes *in vitro*. *Protoplasma* 232: 61–67.
- Lovy-Wheeler, A., K. L. Wilsen, T. I. Baskin and P. K. Hepler. 2005. Enhanced fixation reveals the apical cortical fringe of actin filaments as a consistent feature of the pollen tube. *Planta* 221: 95–104.
- Lush, W. M., F. Grieser and M. Wolters-Arts. 1998. Directional guidance of *Nicotiana glauca* pollen tubes *in vitro* and on the stigma. *Plant Physiol.* 118: 733–741.
- Malhó, R. and A. J. Trewavas. 1996. Localized apical increases

- of cytosolic free calcium control pollen tube orientation. *Plant Cell* 8: 1935–1949.
- Mesejo, C., A. M. Fuentes, C. Reig and M. Agust. 2007. The effective pollination period in ‘Clemenules’ mandarin, ‘Owari’ Satsuma mandarin and ‘Valencia’ sweet orange. *Plant Sci.* 173: 223–230.
- Miao, H., Y. Qin, J. A. T. da Silva, Z. Ye and G. Hu. 2011. Cloning and expression analysis of *S-RNase* homologous gene in *Citrus reticulata* Blanco cv. Wuzishatangju. *Plant Sci.* 180: 358–367.
- 三輪忠珍. 1951. 柑橘の授粉, 受精と落果の研究. 宮崎大学時報 (自然科学). 2: 1–67.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473–497.
- Ngo, X. B., J. H. Kim, A. Wakana, S. Isshiki and T. Mori. 2011. Estimation of self-incompatibility genotypes of *Citrus* cultivars with *Got-3* allozyme markers. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 80: 284–294.
- Ngo, X. B., A. Wakana, J. H. Kim, T. Mori and K. Sakai. 2010. Estimation of Self-incompatibility *S* genotypes of *Citrus* cultivars and plants based on controlled pollination with restricted number of pollen grains. *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.* 55: 67–72.
- Ngo, X. B., A. Wakana, S. M. Park, Y. Nada and I. Fukudome. 2001. Pollen tube behaviors in self-incompatible and self-compatible *Citrus* cultivars. *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.* 45: 443–457.
- Roiz, L., U. Ozeri, R. Goren and O. Shoseyov. 2000. Characterization of *Aspergillus niger* B-1 RNase and its inhibitory effect on pollen germination and pollen tube growth in selected tree fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 125: 9–14.
- Sassa, H., T. Nishio, Y. Kowyama, H. Hirano, T. Koba and H. Ikehashi. 1996. Self-incompatibility (*S*) alleles of the Rosaceae encode members of a distinct class of the T2/S ribonuclease superfamily. *Mol. Gen. Genet.* 250: 547–557.
- Shi, Y. Y., W. J. Tao, S. P. Liang, Y. Lü and L. Zhang. 2009. Analysis of the tip-to-base gradient of CaM in pollen tube pulsant growth using in vivo CaM-GFP system. *Plant Cell Rep.* 28: 1253–1264.
- 孫 太権・金 貞希・森本隆義・S. Park・I. Chung. 2006. 自家不和合性打破剤を処理したリンゴの品質特性. 園学雑. 75 (別2): 265.
- Soost, R. K. 1965. Incompatibility alleles in the genus *Citrus*. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* 87: 176–180.
- Soost, R. K. 1969. The incompatibility gene system in *Citrus*. *Proc. 1st. Int. Citrus Symp.* 1: 189–190.
- 内田飛香・竹中 聡・榊原陽一・黒木重文・本勝千歳・佐々英徳・水光正仁・國武久登. 2009. カンキツ類におけるプロテオーム技術を用いた花柱内タンパク質の解析. 園学研. 8 (別2): 388.
- Ueno, I. 1978. Studies of cross-incompatibility in *Citrus tachibana* Tanaka. *Bull. Fruit Tree Res.* 5: 1–7.
- Ushijima, K., H. Sassa, A. M. Dandekar, T. M. Gradziel, R. Tao and H. Hirano. 2003. Structural and transcriptional analysis of the self-incompatibility locus of almond: identification of a pollen expressed F-box gene with haplotype-specific polymorphism. *Plant Cell* 15: 771–781.
- Ushijima, K., H. Yamane, A. Watari, E. Kakehi, K. Ikeda, N. R. Hauck, A. F. Iezzoni and R. Tao. 2004. The *S* haplotype-specific F-box protein gene, *SFB*, is defective in self-compatible haplotypes of *Prunus avium* and *P. mume*. *Plant J.* 39: 573–586.
- Yahata, M., S. Harusaki, H. Komatsu, K. Takami, H. Kunitake, T. Yabuya, K. Yamashita and P. Toolapong. 2005. Morphological characterization and molecular verification of a fertile haploid pummelo (*Citrus grandis* Osbeck). *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 135: 34–40.
- Yamamoto, M., T. Kubo and S. Tominaga. 2006. Self- and cross-incompatibility of various *Citrus* accessions. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 75: 372–378.
- Yamane, H., K. Ushijima, H. Sassa and R. Tao. 2003. The use of the *S* haplotype-specific F-box protein gene, *SFB*, as a molecular marker for *S*-haplotypes and self-compatibility in Japanese apricot (*Prunus mume*). *Theor. Appl. Genet.* 107: 1357–1361.
- Yamashita, K. 1978. Studies on self-incompatibility of Hyuganatsu, *Citrus tamurana* hort. ex Tanaka. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 47: 188–194.
- Yamashita, K. 1980. Studies on self-incompatibility of Hassaku (*Citrus hassaku* hort. ex Tanaka). I. On the pollen behavior in pistils in self-pollination, and the effect of various treatments to overcome the self-incompatibility. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 49: 49–56.
- Yamashita, K. 1981. Studies on self-incompatibility of Hyuganatsu (*Citrus tamurana* hort. ex. Tanaka). II. On the sequential changes of protein composition in self-pollinated pistils, and the effect of various treatments to overcome the self-incompatibility. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 49: 497–504.
- Ye, W., Y. Qin, Z. Ye, J. A. T. Silva, L. Zhang, X. Wua, S. Lin and G. Hua. 2009. Seedless mechanism of a new mandarin cultivar ‘Wuzishatangju’ (*Citrus reticulata* Blanco). *Plant Sci.* 177: 19–27.
- Zhang, S. L. and S. Hiratsuka. 2005. Analyses of pollen-tube growth and biological action of *S-RNase* in the style of self-compatible Japanese pear. *Sci. Hortic.* 104: 169–178.