

ナスの薬培養における胚様体形成率の向上

瀧川尚子*・三輪龍士**・武田恭明***・矢澤 進*

*京都大学農学部

(〒606-01 京都市左京区北白川追分町)

**三井石油化学工業

(〒740 山口県玖珂郡和木町)

***第一園芸プランテック

(〒410-13 静岡県駿東郡小山町)

(1992年5月19日受付)

(1992年7月9日受理)

ナス(品種‘もぎ’, ‘E12’)を供試し, 培地への活性炭の添加, 薬の採取時期および低温前処理の胚様体形成への影響を検討した。

1. 初代培地への活性炭の添加は花粉のカルス化を抑制し, 胚様体形成を促進した。
2. 薬の採取時期によって胚様体の形成率には大きな差異が認められた。高温期(6~10月)に採取した薬には胚様体の形成は認められなかったが, 低温期(11~12月)に採取した薬には高率で胚様体の形成が認められた。
3. 花蕾への低温前処理の効果は薬の採取時期によって異なっていた。10~11月には花蕾への低温前処理は胚様体の形成を促進したが, 12月には逆に阻害した。

1. 緒 言

従来, 遺伝的に固定された純系を育成する際には, 6~7世代, あるいはそれ以上の自殖が必要とされている。このため, 目的とする形質を固定するには長い年月と労力を要してきた。一方, 半数体を利用した育種法を用いた場合, 半数体の中から優良形質を有するものを選抜し, コルヒチン処理などによる染色体数の倍加を行えば直ちに相同染色体を持つ固定された系統が得られる。これによって育種年限の短縮が可能となり, 非常に効率的であると考えられる。固定系統は直接の品種育成や, ヘテロシス育種での両親系統にも利用できる。また, 得られた半数体は劣性遺伝子による形質を表現するため, 突然変異育種を行う際の優れた材料となる。しかし, 多くの植物種では半数体の作出がまだ容易ではなく, 半数体を利用して育成された実用品種はいくつかの植物種に限られている¹⁻³⁾。

半数体の作出には, 花粉を利用する場合, 花粉からカルスを経由する方法とカルスを形成することなく直接胚

様体を形成する方法があるが, 胚様体経由の方がカルス経由のものより染色体数変異の出現が少ないとされている^{4,5)}。また, 胚様体経由のものはカルス経由のものに比べて植物体の再分化が早く, それに要する労力も少ない。半数体を利用した育種を実用化するには, 多数の半数体が迅速に得られることが必要である。そのためには, 分裂した花粉がカルス化せず, 胚様体へ発達するのを促すことが非常に重要である。

薬培養法は1964年にGuhaとMaheshwari⁶⁾が*Datura*を用いて半数体の作出に成功して以来, 多くの研究者が多数の植物種について試みてきた。ナス(*Solanum melongena* L.)の薬培養による半数体作出に関しては, 中国半数体育種グループによる報告があり, 胚様体経由あるいはカルス経由のいずれの場合にも半数体の作出に成功している⁹⁾。また, 松村らは胚様体を経由することによって植物体の再生に成功している⁷⁾。しかし, 植物体の再生率は0.08%前後と非常に低かった。本研究は, ナスの薬培養において, 胚様体経由によって

半数体を高率で得ることを目的として行ったものである。

2. 材料および方法

品種としては日本ナスの‘もぎ’、インドより導入した‘E12’を供試した。‘E12’は房成性の品種である。栽培は京都大学農学部附属京都農場の雨よけハウス内で行い、5月から12月にかけて花卉の先端ががく片の裂け目から少し見えるような花蕾を採取し、薬を培養に供した。置床する薬は、長さが成熟薬の1/2～3/4、黄色味を帯びた淡緑色でやや硬く、一核期中期から後期の花粉を含むものを用いた。花蕾への低温前処理は、花蕾を採取後直ちに水を含ませたる紙を入れたシャーレ内に入れ、5℃の暗黒条件下におくことで行った。花蕾は70%エタノールで10秒間、次亜塩素酸ナトリウム(有効塩素濃度1%)で10分間滅菌した後、滅菌蒸留水で3～4回すすぎ、薬を摘出した。1本の試験管内には同じ花蕾の薬を置床した。置床後の高温処理は、ナスの薬培養の胚様体形成に効果があると報告されている⁸⁾。また、浅平らの過去の実験結果から、高温処理は薬からのカルス形成を促進することが認められており⁹⁾、ここでは置床後3日間は35℃暗黒条件下で高温処理を行った。その後25℃、3,000 lux、16時間照明下で培養を行った。置床20日後に移植培地で継代培養し、移植30日後にカルスおよび胚様体を形成した薬の数を調査した。1処理区には50～150個の薬を供試した。

培地の組成は主要塩類組成・鉄源として Murashige・Skoog(1962)の処方、微量要素は25 mg/l MnSO₄・4H₂O、10 mg/l H₃BO₃、10 mg/l ZnSO₄・7H₂O、1.0 mg/l KI、0.25 mg/l Na₂MoO₄・2H₂O、0.025 mg/l CuSO₄・5H₂O、0.025 mg/l CoCl₂・6H₂O、および有機

物は2 mg/l グリシン、100 mg/l ミオイノシトール、5 mg/l ニコチン酸、0.5 mg/l 塩酸ピリドキシン、0.5 mg/l 塩酸チアミン、0.05 mg/l ビオチン、0.5 mg/l 葉酸とし、Ringe・Nitsch(1968)の処方のものとした。初代培地には0.1 mg/l 2,4-D、0.1 mg/l Kinetin、30 g/l Sucrose、2 g/l Gelrite を添加し、pH 5.8 に調整後、1.2 気圧、120℃、15 分間高圧蒸気滅菌した。試験管は直径24～25 mm で長さ150 mm のものを用い、1本あたり10 ml の培地を分注した。分注後、綿をつめたステンレス製キャップ(モルトン栓)で栓をした。移植培地は上記の初代培地から2,4-Dを除いたものを用いた。

アネモネ属では、培地への0.1～5%の活性炭の添加によって胚様体形成率が高まっている¹⁰⁾ことから、本実験では初代培地に活性炭を0.1%の濃度で添加した。また、活性炭添加培地上での培養期間を検討した実験では、活性炭を添加した初代培地で5,10,15,20日間培養した後、活性炭を添加していない培地に移植した。その後の培養は他の実験と同様に行い、置床後20日後に移植培地で培養し、移植30日後に調査を行った。

3. 結 果

(1) 初代培地への活性炭添加の影響

1988年10月29日の置床薬については、‘もぎ’では0.1%活性炭添加区で、対照区の3倍以上の胚様体の形成が認められた(Table 1)。また、‘もぎ’および‘E12’で、活性炭の添加はカルス形成率を低下させた。

さらに、活性炭添加培地上での培養期間がカルスおよび胚様体の形成に及ぼす影響についても検討した。その結果、活性炭添加培地上での培養日数が10日以上になると、カルスの形成率は著しく低下した(Table 2)。一

Table 1. Effect of activated charcoal supplement in primary medium on anther response in anther culture of eggplant*1.

Cultivar	Treatment	Number of inoculated anthers	Percentage of anthers forming callus*2	Percentage of anthers forming embryoids*3
E12	Without charcoal	80	41.3	1.3
	0.1% activated charcoal added	100	0	1.0
Mogi	Without charcoal	100	58.0	3.0
	0.1% activated charcoal added	100	1.0	10.0

After 20 days of inoculation on primary medium, the anther was transplanted to secondary medium. Primary medium: MS+0.1 mg/l 2,4-D+0.1 mg/l kinetin+30 g/l sucrose+2 g/l Gelrite. Secondary medium: MS+0.1 mg/l kinetin+30 g/l sucrose+2 g/l Gelrite.

*1 Inoculation was made on 29 October 1988. Callus and embryoid formation was examined after 50 days of anther inoculation.

*2 (Number of anthers forming callus/Number of anthers inoculated)×100(%).

*3 (Number of anthers forming embryoids/Number of anthers inoculated)×100(%).

Table 2. Effect of duration of culture on primary medium supplemented with activated charcoal on embryoid formation in anther culture of 'E12'*¹.

Duration of culture on primary medium (days)	Number of inoculated anthers	Percentage of anthers forming callus* ²	Percentage of anthers forming embryoids* ³
5	100	27.0	1.0
10	100	7.0	2.0
15	100	2.0	0
20	100	1.0	4.0

After 20 days of inoculation on primary medium, the anther was transplanted to secondary medium.

Primary medium: MS+0.1 mg/l 2, 4-D+0.1 mg/l kinetin+30 g/l sucrose+2 g/l Gelrite+0.1% activated charcoal.

Secondary medium: MS+0.1 mg/l kinetin+30 g/l sucrose+2 g/l Gelrite.

*¹ Inoculation was made on 2 November 1989. Callus and embryoid formation was examined after 50 days of anther inoculation.

*² (Number of anthers forming callus/Number of anthers inoculated) × 100 (%).

*³ (Number of anthers forming embryoids/Number of anthers inoculated) × 100 (%).

Table 3. Seasonal changes of the rate of embryoid formation in anther culture of 'E12'*¹.

Cultivar	Percentage of anthers forming embryoids* ²							
	Date of inoculation							
	27 May	29 June	21 July	21 Aug.	22 Oct.	5 Nov.	19 Nov.	13 Dec.
E12	2.0	0	0	0	0	6.7	21.1	20.2
Mogi	—	0	0	0	0	1.2	1.6	4.2

After 20 days of inoculation on primary medium, the anther was transplanted to secondary medium.

Primary medium: MS+0.1 mg/l 2, 4-D+0.1 mg/l kinetin+30 g/l sucrose+2 g/l Gelrite+0.1% activated charcoal.

Secondary medium: MS+0.1 mg/l kinetin+30 g/l sucrose+2 g/l Gelrite.

*¹ Embryoid formation was examined after 50 days of anther inoculation. In 1990, inoculation was made on 21 July, 21 August, 22 October, 5 December and 19 December. In 1991, inoculation was made on 27 May and 29 June.

*² (Number of anthers forming embryoids/Number of anthers inoculated) × 100 (%).

方、胚様体の形成率は活性炭添加培地での培養日数が20日の時最も高かった。

これらの結果より、以下の実験には活性炭を添加した初代培地を用い、その培地上での培養期間は20日とした。

(2) 葯の採取時期の影響

これまでの予備試験の結果から、夏期には胚様体形成率が低く、冬期には高くなる傾向が認められてきた。今回の実験では、5月から12月に採取した葯を用い、採取時期の影響を詳細に検討した。

'E12'では、5月27日に置床した葯で胚様体形成率は2.0%であり、その後6月29日から10月22日までの置床葯の胚様体形成率は0%であった。しかし、その後胚様体形成率は著しく高まり、11月5日に置床した葯では6.7%、11月19日に置床した葯では21.1%、12

月13日に置床した葯では20.2%であった。また、'もぎ'でも6月29日から10月22日までの置床葯の胚様体形成率は0%であったが、11月5日から12月13日にかけて置床した葯の胚様体形成率は高まった(**Table 3**)。

(3) 低温前処理の影響

1989年の実験では、葯の低温前処理によって胚様体形成率は著しく向上した(**Table 4**)。無処理区では胚様体形成率は4.0%であったのに対し、低温前処理期間が5, 10, 15日のいずれの処理区においても胚様体形成率は10%以上を示した。

しかし、1990年の実験では、葯の採取時期の違いによって低温前処理の効果に差異が認められた(**Table 5**)。7月から8月にかけて無処理区および低温前処理区で胚様体の形成は認められなかった。低温前処理の効果は、

Table 4. Effect of duration of preincubation at 5°C on embryoid formation in anther culture of 'E12'*¹.

Days of pre-incubation	Number of inoculated anthers	Percentage of anthers forming embryoids* ²	Number of total embryoids
0	100	4.0	4 (1.0) * ³
5	200	12.5	68 (2.7)
10	200	15.5	55 (1.8)
15	240	10.8	36 (1.4)

After 20 days of inoculation on primary medium, the anther was translated to secondary medium.

Primary medium: MS+0.1 mg/l 2,4-D+0.1 mg/l kinetin+30 g/l sucrose+2 g/l Gelrite+0.1% activated charcoal.

Secondary medium: MS+0.1 mg/l kinetin+30 g/l sucrose+2 g/l Gelrite.

*¹ Inoculation was made on 5 December 1989. Embryoid formation was examined after 50 days of anther inoculation.

*² Number of anthers forming embryoids/Number of anther inoculated) × 100 (%).

*³ Figures shown in parenthesis are number of embryoids per anther.

Table 5. Effect of preincubation at 5°C on embryoid formation*¹.

Cultivar	Days of preincubation	Percentage of anthers forming embryoids* ²				
		Date of inoculation				
		21 July	21 Aug.	22 Oct.	19 Nov.	13 Dec.
E12	0	0	0	0	21.1	20.2
	5	0	0	6.3	18.0	7.3
	10	—* ³	—	—	—	5.7
Mogi	0	0	0	0	1.6	4.2
	5	0	0	0	13.7	2.3
	10	—	—	—	—	0

After 20 days of inoculation on primary medium, the anther was transplanted to secondary medium.

Primary medium: MS+0.1 mg/l 2,4-D+0.1 mg/l kinetin+30 g/l sucrose+2 g/l Gelrite+0.1% activated charcoal.

Secondary medium: MS+0.1 mg/l kinetin+30 g/l sucrose+2 g/l Gelrite.

*¹ Embryoid formation was examined after 50 days of anther inoculation.

*² (Number of anthers forming embryoids/Number of anthers inoculated) × 100 (%).

*³ unexamined.

'E12'の10月22日に置床した葯で、'もぎ'の11月19日に置床した葯で認められた。しかし、11月19日に置床した'E12'の葯では低温前処理はほとんど効果がなく、12月13日に置床した'E12'と'もぎ'の葯では逆に胚様体の形成を阻害した。この阻害効果は'E12'の12月13日に置床した葯において著しく、胚様体形成率は無処理区と比較して約1/3に低下した。

なお、得られた胚様体から育成した植物体の染色体数や花粉稔性について調査したところ、'E12'では46.4%の割合で半数体であることが確認された。半数体以外の倍数体については、培養中の細胞における核内有糸分裂によるものかどうかは不明である。

4. 考 察

(1) 初代培地への活性炭添加の影響

葯培養において培地に活性炭を添加するという試みは田中¹¹⁾や Nakamura¹²⁾によって報告されて以来、胚様体形成に対して数多くの良好な結果が得られているが、そのメカニズムについてはまだ明らかとはなっていない。

今回の実験では活性炭の添加によってカルス形成が抑制され、胚様体形成が高まった。1989年7月11日にも同様の実験を行ったが、カルス形成に関して同様の傾向が認められた。この場合、胚様体形成率は非常に低かったため、この時期における活性炭の添加の影響を評価することは困難であった。これらのことは、培養に伴って

増加した過剰のオーキシンを活性炭が吸着することにより、薬内のオーキシンの濃度が低くなり、胚様体形成に最適な薬内環境が作られ、その濃度ではカルス形成が抑制されたものと考えられる。このような活性炭によるオーキシンの吸着については Weatherhead らの報告がある¹³⁾。

一般には、活性炭は培養器内の有害物質を吸着するため、その培地への添加は胚様体の形成を促進すると考えられている。寒天に含まれる不純物や、オートクレーブによって培地中のしょ糖から生じ胚様体形成を阻害する HMF (5-Hydroxymethylfurfural) などが有害物質として考えられており、これらは活性炭によって吸着されると報告されている^{13,14)}。また、培養によって生じる薬壁あるいは発達した胚様体からの胚様体形成阻害物質を活性炭が吸着しているという報告もある^{15,16)}。本実験でも、活性炭添加培地での培養日数が 20 日の場合に胚様体の形成は最も高かった。培養開始から 20 日後までは薬壁からの胚様体形成阻害物質が培地中に放出され、活性炭はそれを吸着したために胚様体形成率が高まったものと思われる。

(2) 薬の採取時期の影響

胚様体の形成は薬の採取時期によって大きく影響された。11 月を境として以後胚様体形成率が著しく高まるが、この理由は明らかではない。Maheshwari らは季節による薬の反応性の違いは、温度や光条件によるものであるとしている¹⁷⁾。今回の実験でも、11 月から 12 月にかけて胚様体形成率が高まったのは気温の低下あるいは短日条件によるところが大きいのかかもしれない。この時期には、これらの条件によって、薬を採取する親植物体の生理状態も高温期のものとはかなり異なっているものと考えられる。親植物体への植物生長調節物質の施用による内生ホルモンレベルの変化や、養分状態によって置床後の花粉の分裂が促進あるいは抑制されることが報告されている¹⁸⁾。

(3) 低温前処理の影響

薬培養において低温前処理がなぜ効果があるのかその原因はまだ知られていないが、花粉の老化、退化を遅らせ、花粉の活性を維持させる効果があるといわれている¹⁹⁾。また、低温処理は花粉粒を分裂させ、胚様体の形成を誘導する段階で作用していると考えられている²⁰⁾。今回の実験において、12 月に 'E12' で認められた低温前処理の胚様体形成に及ぼす阻害効果は、すでに外界の低温で正常な発育を阻害され、胚様体形成の方向に誘導されていた花粉にさらに低温を与えることにより、胚様体形成のための細胞分裂の進行が阻害されたものと考えら

れる。また、親植物体を地際で切り取り 1~2 日間水挿ししておくことや、窒素飢餓条件におくことにより、胚様体形成率が高まるという報告がある²¹⁾。本実験での低温処理は、花蕾を水を含ませたシャーレ内に暗黒条件下で 5~15 日間おくことで行ったため、先に述べた親植物体を養分飢餓状態においた場合と同様の効果があったものと思われる。

これまでの報告ではナスの半数体作出率はきわめて低く⁷⁾、優良系統を選抜し得るほどの再生植物体を獲得するには非常に多くの労力を要していた。よって、効率的に半数体を獲得する手法を確立することには大きな意義がある。今回の実験の結果では、11 月には 'E12' の活性炭添加区の胚様体形成率は 20% 以上に、'もぎ' の活性炭添加と低温前処理を組み合わせた区では、活性炭添加のみの区と比較して 8 倍以上に高まった。このように薬の採取時期の適切な選択と培地への活性炭添加、花蕾への低温前処理を組み合わせることによってナスの半数体を高率で得ることが可能となった。

文 献

- 1) Wu, J. L., L. Q. Zhong, F. H. Nong, M. L. Cheng, H. Y. Zhang, B. L. Zheng, 1983. *Sci. Sin.*, **26**: 725-733.
- 2) Zhang, Z. H., Z. L. Zhen, L. L. Zhang, H. X. Chao, Y. H. Gao, 1984. *Plant Tissue Cult.*, **3**: 1-7.
- 3) 湊 莞爾, 蔭山節雄, 福嶋雅明, 1988. 園学要旨, 昭 63 春: p. 176-177.
- 4) Niizeki, M., F. Kita, 1980. *J. Fac. Agric. Hokkaido Univ.*, **60**: 1-9.
- 5) Research group of haploid breeding, Institute of vegetables, Chinese academy of agricultural science, 1978. In "Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture, Peking", p. 227-233, Science Press, Peking.
- 6) Guha, S., S. C. Maheshwari, 1964. *Nature*, **204**: 497.
- 7) 松村政弘, 大曾根兼一, 田中繁男, 1989. 育学雑, **39** (別 1): p. 64-65.
- 8) Dumas de Vaulx, D. Chambonnet, 1982. *Agronomie*, **2**: 983-988.
- 9) 浅平端, 1990. 平成元年度科学研究費補助金研究成果報告書.
- 10) Johansson, L., T. Eriksson, 1977. *Physiol. Plant.*, **40**: 172-174.
- 11) 田中正雄, 1971. 育学雑, **21** (別 1): p. 126-127.
- 12) Nakamura, A., R. Itagaki, 1973. *Japan. J. Breed.*, **23**: 71-78.
- 13) Weatherhead, M. A., J. Burdon, G. G. Henshaw, 1978. *Z. Pflanzenphysiol.*, **89**: 141-147.
- 14) Wernicke, W., H. W. Kohlenbach, 1976. *Z. Pflanzenphysiol.*, **79**: 189-198.
- 15) Weatherhead, M. A., J. Burdon, G. G. Henshaw, 1979. *Z. Pflanzenphysiol.*, **94**: 399-405.
- 16) Johansson, L., 1983. *Physiol. Plant.*, **59**: 397-403.
- 17) Maheshwari, S. C., A. K. Tyagi, K. Malhotra, S. K.

- Sopory, 1980. Theor. Appl. Genet., **58**: 193-206.
- 18) Heberls-Bors, E., 1983. Physiol. Plant., **59**: 67-72.
- 19) Duncan, E. J., E. Heberle, 1976. Protoplasma, **90**: 173-177.
- 20) Johansson, L., T. Eriksson, 1984. Physiol. Plant., **60**: 26-30.
- 21) Maheshwari, S. C., A. Rashid, A. K. Tyagi, 1982. Amer. J. Bot., **69**: 865-879.

Summary

Enhancement of Embryoid Production in Anther Culture of Eggplant (*Solanum melongena* L.)

Naoko TAKIKAWA*, Tatsushi MIWA**, Yasuaki TAKEDA*** and Susumu YAZAWA*

*Faculty of Agriculture, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-01, Japan

**Mitsui Petrochemical Industries, Ltd., Waki-cho, Kuga-district, Yamaguchi 740, Japan

***Dai-ichi Engei Plantech Co., Ltd., Oyama-cho, Sunto-district, Shizuoka 410-13, Japan

In this experiment enhancement of embryoid production in anther culture of eggplant (cv. Mogi and E12) was investigated.

1. The addition of activated charcoal to the primary medium inhibited callus formation and promoted embryoid formation.
2. The frequency of embryoid formation depended on the season in which anthers were collected. Embryoid formation was observed in November and December, but there was no embryoid formation from June to October.
3. The effect of preincubation at 5°C of the flower buds on embryoid formation changed from October to December. In October and November, preincubation at 5°C of the flower buds promoted embryoid formation, while in December, it was inhibited.