

ナスの葯培養によるカルス及び胚様体形成に及ぼす 温度処理の影響

徳毛 謙治・村上 賢治・松原 幸子
(生物機能・遺伝資源開発学講座)

Embryoid and Callus Formation from Eggplant Microspores by Culture of Anthers Treated with High and Low Temperatures

Kenji Tokumo, Kenji Murakami and Sachiko Matsubara
(Department of Biological Function and Genetic Resources Science)

Anthers containing uninucleate microspores of eggplant cv. 'Wase-Shinkuro' were cultured on MS medium supplemented with 0.02 mg/l 2,4-D and kinetin, 3% sucrose and 0.2% Gelrite with high and low temperature treatments to increase number of haploids, in early August and September and on November 4, 1992.

Anthers plated were kept heated at 35°C for 48h in early November, and callus and embryoid were formed from microspores. The frequency of anthers forming callus was as high as 28% in treated anthers, but 14% in non-treated ones. Embryoids were obtained only in treated anthers, and the frequency of anthers forming embryoid was 5.1%.

On the other hand, low temperature pretreatments at 4°C for 0, 5 or 10 days to flower buds in summer season were ineffective for embryoid formation and inhibitory for callus formation with treatment for longer periods.

Key words : eggplant, anther culture, temperature treatments, callus formation, embryoid formation

緒 言

半数体を利用した作物育種は、その染色体を倍加することにより、ただちに遺伝的にホモの個体を得ることができ、育種年限の短縮の有効な手段であると認められている。また完全ホモ個体である半数体倍加個体では劣性遺伝形質が表現されるため、育種を行なう際の優れた材料となる。現在この半数体植物を得る手法として葯培養や花粉培養などが知られている。

葯培養による半数体の作出については、1964年に Guha と Maheshwari³⁾が *Datura* において成功して以来、種々の作物で半数体の作出が報告されている。しかし多くの植物種では葯培養で得られる半数

体の数が少ないことなどのために、実際の育種に利用することが困難である。ナスに関しても、過去にいくつかの葯培養による半数体作出例があるが、半数体形成率が低いため、まだ実用化には問題がある。葯培養により半数体を作成する場合、葯内の花粉からカルスを形成させそれから植物体を再生させる方法と、直接胚様体を形成させる方法があり、ナスではこの両方の経路で半数体を得ることができる⁶⁾。しかし胚様体経由の方がカルス経由の方法よりも染色体変異の出現が少ないとされている⁶⁾。また、胚様体経由の方法はカルス経由の方法に比べ植物体の再分化が早く、それに要する労力も少なくてすむ。した

Received October 4, 1994

がって、半数体を利用した育種を実用化するためには、多数の胚様体が効率よく得られることが重要であると考えられる。

本研究はナスの葯培養による半数体植物の形成率を向上させる目的で行なったものである。葯培養による半数体の形成頻度に影響を与える要因の一つとして花蕾または葯の前処理があげられる。葯培養における葯置床後の高温処理が半数体形成率の向上に効果があることが多くの植物種に関して報告されている。本研究では葯置床後 2 日間の 35℃ での高温処理の影響について調査した。

またナスの葯培養によるカルス・胚様体形成率には季節変動がみられ、高温期に比べ低温期のほうが形成率が高く、特に胚様体は高温期にはほとんど形成されないことが報告されている⁹⁾。もし高温期にも胚様体が形成されるようになれば、開花期間中ずっと胚様体を得ることが可能となり半数体育成効率は非常に向上する。そこで高温期に花蕾を低温処理することによって、低温期の花粉と同じ状態にできるかどうかを調べるために本実験を行なった。葯培養における花蕾の低温処理の有効性については、いくつかの植物種においてこれまでも多くの研究者が述べている。例えば、ピーマンの葯培養では、花蕾に対する 4 日間の低温処理が胚様体形成に対して効果が高いことが報告されている⁹⁾。そこで本実験では、ナス葯培養における花蕾の低温処理のカルス・胚様体形成に対する効果について調査した。

材料と方法

1. 葯置床後の高温処理がカルス・胚様体形成に及ぼす影響

植物材料として、ナス (*Solanum melongena* L.) の栽培品種‘早生真黒’を用いた。岡山大学園場で栽培した植物体から、1992年11月4日に 1 核期中期～後期の花粉を含む花蕾を採取し供試材料とした。

花蕾の滅菌は次の手順で行なった。採取した花蕾をガーゼで包み、70%エタノールに30秒浸漬した。その後アンチホルミン (次亜塩素酸ナトリウム) 6～7 倍液 (活性塩素 1.1～1.4%) に15分間浸漬し、滅菌水で3～4回すすいだ。

滅菌後、花蕾から葯を摘出し、花糸接合部が傾斜培地の上側にくるように置床した。試験管 1 本あたり同じ花蕾由来の 3 葯を置床した。

本研究を通じて Murashige & Skoog⁵⁾ 培地 (以後 MS 培地と記す) に 0.02mg/ℓ 2,4-D と 0.02mg/ℓ kinetin, 3% ショ糖, 0.2% Gelrite を添加した培地を用いた。試験管に 1 本あたり 10ml の培地を分注した。pH はオートクレーブによる高圧蒸気滅菌 (1.2atm, 15分) の前に 5.8 に調整した。高圧蒸気滅菌の後、試験管を傾け傾斜培地にした。置床後の温度処理は 35℃ で 48 時間とした。対照区として置床後温度処理せずに 25℃ で連続培養した。温度処理は暗黒条件下で行なった。処理後 25℃, 1500lx, 16 時間日長で培養し、置床 40 日後にカルス・胚様体の有無を観察した。カルス・胚様体形成葯率は、培養した葯数に対するカルス・胚様体を形成した葯数の百分率で示した。

得られた胚様体はホルモンフリーの MS 培地に移植し、植物体を再生をさせ、順化を試みた。

2. 花蕾の低温処理がカルス・胚様体形成に及ぼす影響

植物材料は 1 と同様であり、夏期高温期の 1992 年 8 月 3 日および 9 月 12 日に 1 核期中期～後期の花粉を含む花蕾を採取した。1 と同様の方法で花蕾を滅菌したのち、花蕾はガーゼに包んだまま、湿らせたろ紙をしいたシャーレに入れ、蓋をして 4℃ の冷蔵庫内に置いた。0, 5, 10 日後、花蕾から葯を摘出し培地に置床した。置床後 35℃ 暗黒下で 48 時間培養し、その後、25℃, 照度 1500lx, 16 時間日長で培養した。置床 40 日後にカルス・胚様体の形成葯率を調査した。

結 果

1. 葯置床後の高温処理がカルス・胚様体形成に及ぼす影響

培養 40 日後までに、Fig. 1 に示したように、2 種類のカルスが形成された。ひとつは花糸接合部に形成されたカルスで、もうひとつはそれ以外の部位に形成されたカルスであった。前者のカルスは置床後 15 日頃から肉眼で認められるようになり、その後盛んに増殖し、形成葯率も約 90% と非常に高かったが、体細胞から形成されたものと推定されたので半数体育成の対象から除外した。一方、後者のカルスは花粉粒から形成されたと考えられるもので、20 日後頃から認められるようになり、増殖は遅かった (この後、単に‘カルス’と記した場合は後者のカルスを示す)。

葯置床後の高温処理はカルス及び胚様体形成に有

効であった(Table 1). カルス形成率については、対照区では13.9%であったのに対し、高温処理区では28.2%と約2倍の形成率が得られた。また胚様体形成は高温処理区でのみ認められた。胚様体は置床後30日頃から肉眼で認められるようになった(Fig. 1)。

本実験により合計2個の正常な胚様体が得られたが、1個はカルス化し、正常な植物体となったのは1個体であった。

2. 花蕾の低温処理がカルス・胚様体形成に及ぼす影響

カルス形成率について、低温処理の効果は認め

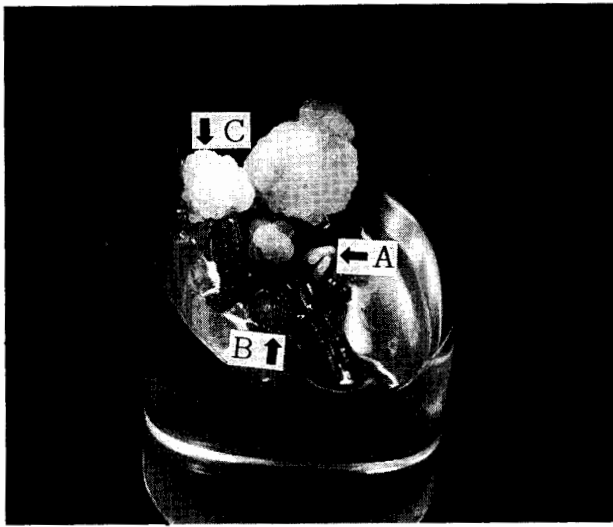


Fig. 1 Embryoid and callus formation from anther of eggplant.

A : Embryoid formed from microspores.

B : Callus formed from microspores.

C : Callus formed from the cut end of filament.

られなかった(Table 2). カルス形成率は、低温処理を行なわなかったとき8.9%であり、5日間処理した場合は4.2%と、むしろカルス形成を阻害した。10日間の低温処理を施した花蕾の葯は、摘出時にすでに褐変していた、また花糸接合部に形成されたカルスの形成率も対照区では93.3%であったのに対し10日間処理を行なった場合は0%であったことから、10日間という低温処理期間は長すぎると考えられた。またいずれの処理区においても胚様体は形成されず、夏期高温期の胚様体形成は依然として困難であることがわかった。

考 察

1. 葯置床後の高温処理がカルス・胚様体形成に及ぼす影響

多くの植物種の葯培養において、高温処理がカルス・胚様体形成を促進することが知られている。ナスにおいても、Dumasらが置床後35°C 8日間の高温処理が胚様体形成に効果があること²⁾、また浅平が短期間の高温処理(35°C-24, 72時間)がカルス・胚様体形成を促進すること¹⁾を報告している。本実験においてもこれらと同様の結果が得られた。

葯置床後の短期間の高温処理によりカルス及び胚様体形成率が向上する原因として、温度ショックによる花粉の生理状態の変化、あるいは呼吸活性が高まることにより飢餓状態が誘起されたことなどが考えられる。しかし高温処理が胚様体形成を促進するメカニズムは、現在のところ充分には明らかになっていない。また胚様体から順化した植物体を得るには、今後、植物体の再生や順化の方法について検討

Table 1 Effects of high temperature treatment (35°C) to anthers on formation of callus and embryoid in eggplant

Period of high temperature treatments	Number of cultured anthers	Percentage of anthers forming calli	Percentage of anthers forming embryoids
0	36	13.9	0
48 hr	39	28.2	5.1

Table 2 Effects of low temperature treatment (4°C) of flower buds on formation of callus and embryoid in eggplant

Days of low temperature treatments	Number of cultured anthers	Percentage of anthers forming calli	Percentage of anthers forming embryoids
0	45	8.9	0
5	48	4.2	0
10	48	2.1	0

が必要である。

2. 花蕾の低温処理がカルス・胚様体形成に及ぼす影響

ナスの葯培養によるカルス・胚様体形成率は低温期のほうが形成率が高く、特に胚様体は高温期にはほとんど形成されないことがわかっている⁴⁾。このことから前処理として花蕾に低温処理を行えば、高温期に採取した葯の培養においても胚様体形成率を向上させることができるのではないかと考え、夏期高温期に葯を採取し、本実験を行なった。しかし本実験では、花蕾の低温処理によりカルスまたは胚様体の形成は促進されなかった。これは花粉の発育過程で1時期のみに低温を与えてもカルス・胚様体形成には効果がない、または低温を与えたときの花粉の令(1核期中期～後期)が適切ではなかったことを示している。またこの実験では母植物体から切り離した、つまり栄養などの供給が完全に止まった状態で低温を与えているため、植物体全体が低温を受ける場合とは低温の効果が異なると推測される。

ナスの葯培養による胚様体形成に対する花蕾に対する低温処理の効果に関しては、7月から8月に培養を行なった場合は効果がなかったが、10月または11月にはその効果が認められたという報告がある⁷⁾。したがって低温処理は、低温期に葯を培養したときの胚様体形成を促進する効果はあるが、高温期の葯で胚様体形成を促す効果はないと考えられる。

したがって、今後、葯中の花粉のどの令にどのような方法で低温処理を行なうのがもっとも有効かということを検討するとともに、その他の要因との関連についても考慮しなければならない。

要 約

ナス(品種‘早生真黒’)を供試し、葯培養におけるカルス及び胚様体形成を高めるために高温処理を試みた。培地はMS培地に2,4-Dとkinetinをそれぞれ0.02 mg/l, ショ糖を3%, Gelriteを0.2%添加したものとした。葯は11月上旬に採取したものをを用いた。カルス形成率は対照では14%であったのに対

し、葯置床後35℃で48時間の高温処理を行なった場合は28%と約2倍まで向上した。また胚様体は高温処理区のみで得られた。

また、夏期に同様の品種、培地を用いて花蕾に対する低温処理(4℃-0, 5, 10日)の効果について検討した。低温処理の効果は認められず、カルス形成率は処理日数が長くなるにつれて低下した。また胚様体はいずれの区でも形成されなかった。

文 献

- 1) 浅平 端：半数体利用による日本ナスへの房成り性導入。平成元年度科学研究費補助金(一般研究B)研究成果報告書, (1990)
- 2) Dumas de Vaulx and D. Chambonnet: Culture in vitro d'anthères d'aubergine (*Solanum melongena* L.): Stimulation de la production de plantes aunoyen de traitements à +35°C associés à de faibles teneurs en substances de croissance. *Agronomie*, **2**, 983-988, (1982)
- 3) Guha, S. and S. C. Maheshwari: In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature*, **204**, 497, (1964)
- 4) 松原幸子・徳毛謙治・村上賢治：ナスの栽培，台木用品種の葯培養による時期別のカルスと胚様体形成。園芸学会雑誌, **62** (別1), 196-197, (1993)
- 5) Murashige, T. and F. Skoog: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497, (1962)
- 6) Research group of haploid breeding, Institute of vegetables, Chinese academy of agricultural science: Induction of haploid plants of *Solanum melongena* L. in Proceeding of Symposium on Plant Tissue Culture, Peking, pp. 227-233, Science Press, Peking, (1978)
- 7) 瀧川尚子・三輪龍士・武田恭明・矢澤 進：ナスの葯培養における胚様体形成率の向上。植物組織培養, **9**, 184-189, (1992)
- 8) 矢ノ口幸夫・坂田好輝・門馬信二・西尾 剛：ピーマンの葯培養における低温処理期間及び方法が胚様体形成に及ぼす影響。園芸学会雑誌, **59** (別2), 264-265, (1990)