

# ナス蒴培養における効率的な胚様体作出法

## Embryoid Formation from Eggplant Microspores by Anther Culture

猿渡 真\*・飯牟禮 和彦

Makoto SARUWATARI and Kazuhiko IIMURE

### 要 約

蒴培養による効率的なナス半数体作出のため、採花母本株の栽培条件、採取する花蕾のステージ、花蕾の5℃・暗黒条件期間、胚様体誘導培地での蒴の35℃・暗黒条件期間及び胚様体誘導培地成分の胚様体形成率に及ぼす影響を“米ナス”及び熊本長ナス系統と“米ナス”との交雑系統を供試して検討した。

1. 採花母本株は昼温35℃・夜温25℃より昼温25℃・夜温20℃の条件下で胚様体形成率が高かった。また、開花初期から18日後が最も胚様体形成率が高く、46日以降は胚様体はほとんど形成されなかった。
2. 蒴を取り出す花蕾のステージとしては、がく先が開く前で、花蕾の太さが8mm 台、長さが22mm 程度の大きさの花蕾が最も胚様体形成率が高かった。
3. 花蕾の5℃・暗黒条件期間及び胚様体誘導培地での蒴の35℃・暗黒条件期間としては、いずれも3日間が最も高い胚様体形成率を示した。
4. 胚様体誘導培地成分としては、硝酸銀を10mg/l 添加することにより、または、熊本長ナス系統と“米ナス”との交雑系統ではショ糖濃度を3%から7%に高めることにより胚様体形成率が高くなった。

キーワード：ナス、蒴培養、胚様体、半数体

### I 緒言

F1品種育成には、その交配親となる固定系統の作出が必要である。従来の自殖による方法では固定化に長期間を要するのに対し、半数体が作出できれば倍加することによりただちに固定系統を作出することができる。半数体を作成する方法としては、蒴培養、花粉培養、小孢子培養、及び偽受精胚珠培養が知られている。ナスでは蒴培養により、カルス経由、あるいは直接胚様体を形成させ半数体を作成することができるが、いずれの場合も半数体作出効率が低く実用的に問題があるのが現状である。

本研究では、ナスの蒴培養においてカルス経由に比べて培養変異が少ない胚様体を形成させる方法により半数体を効率的に作出する条件を検討した。

### II 材料及び方法

“米ナス”（品種名：Dobrix）及び熊本長ナス系統“No. 9”“No. 60”と“米ナス”との交雑系統の花蕾を供試した。

母本株から花蕾をがく先が開く直前に採取後、水で湿らせたろ紙を入れたシャーレ中で5℃・暗黒条件下10日

間静置した。その後、滅菌した花蕾から蒴を取り出し、Murashige & Skoog 培地<sup>1)</sup>（以後、MS 培地）に2, 4-D（0.1mg/l）、カイネチン（0.1mg/l）、ショ糖（3%）、活性炭（0.1%）及び抗菌剤（Plant Preservation Mixture:2ml/l）を添加し、pH5.8に調整後、ゲルライト（0.3%）で固化した胚様体誘導培地に置床した。置床後3日間は35℃・暗黒条件下で、その後は25℃・16時間2,000lux 条件下で培養した。置床20日目に蒴の色を調査し、発芽培地に蒴を移植した。発芽培地は、MS 培地にカイネチン（0.1mg/l）及びショ糖（3%）を添加し、pH5.8に調整後、ゲルライト（0.3%）で固化した。25℃・16時間2,000lux 条件下約2ヶ月間培養後、胚様体形成率（胚様体を形成した蒴の割合）を調査した。

以下の条件が胚様体形成率に及ぼす影響について検討した。

#### 1 採花母本株の栽培条件

##### 1) 採花母本株の温度条件と花蕾の採取時期

母本株の苗を1/2,000a ワグネルポットに移植し、開花初期（2004年8月1日）に昼温25℃・夜温15℃（25/15℃区）と昼温35℃・夜温25℃（35/25℃区）の

\*：鹿本地域振興局農林部農業普及指導課

温度条件下に各系統9株を移し、その後3ヶ月間、9回にわたり採取した花蕾を供試した。胚様体誘導培地にはオートクレーブ後に硝酸銀 (10mg/l) を添加した。

2) 採花母本株の草勢

2004年12月17日から2005年5月31日までの期間に草勢維持のため、追肥及び整枝をおこなった母本株とこれらの管理をおこなわなかった母本株各3株から採取した花蕾を供試した。追肥は2005年1月31日と3月25日の2回、CDU (N:P:K=15:15:15) を1回1株当たり3g程度おこなった。整枝は2005年2月15日と3月25日の2回おこなった。

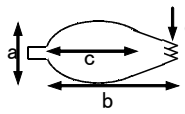
1) 2) のいずれの試験も胚様体形成率を比較した。

2 採取する花蕾のステージ

母本株から採取する花蕾のステージを、がく先が開く直前を対照 (③) とし、これより前の2ステージ (①②) 及び、がく先が開いた後 (④) で採取した花蕾の葯を置床し、葯の色と胚様体形成率を比較した。採取時の花蕾の各部位の大きさを第1表に示す。

第1表 採取時の花蕾の状態

ステージ	調査花蕾数	各部位の大きさ (mm)			
		a	b	c	d
①	16	7.6	20.5	12.7	-
②	16	8.5	22.1	13.6	-
③	16	9.8	26.6	16.3	-
④	12	9.4	23.5	16.2	+



※ d は花先の開き具合 +:開 -:閉

3 花蕾の5℃・暗黒条件期間

母本株から採取した花蕾を5℃・暗黒条件下で静置する期間について、0、3、7、10日間 (対照) とし、葯の色と胚様体形成率を比較した。

4 葯の35℃・暗黒条件期間

葯を胚様体誘導培地に置床した直後の35℃・暗黒条件下で培養する期間について、0、3 (対照)、5日間とし、葯の色と胚様体形成率を比較した。

5 胚様体誘導培地条件

1) 硝酸銀添加

オートクレーブ後、無添加を対照として硝酸銀を10mg/l 添加した。

2) ショ糖濃度

ショ糖濃度について、3 (対照)、5、7%とした。

3) L-グルタミン添加

オートクレーブ後、無添加を対照としてL-グルタミンを0.1g/l 添加した。

1) については、葯の色と胚様体形成率を、2) 3)

については、胚様体形成率を比較した。

III 結果及び考察

1 採花母本株の栽培条件

1) 採花母本株の温度条件と花蕾の採取時期

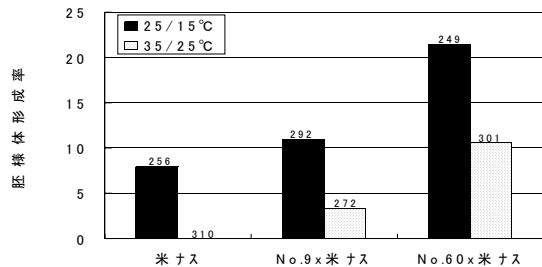
花蕾を採取した3ヶ月間の合計では、各供試系統とも25/15℃区が35/25℃区と比較して胚様体形成率が高かった。供試系統別では“米ナス”よりも熊本長ナス系統と“米ナス”との交雑系統で高かった (第1図)。

花蕾採取時期との関係では、開花初期から18日後をピークにいずれの供試系統も低下し、46日以降はほとんど胚様体は形成されなかった (第2図)。

2) 採花母本株の草勢

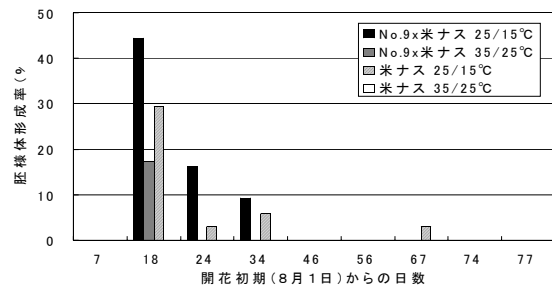
母本株の草勢の違いが胚様体形成率に与える影響は確認できなかった (第3図)。

ナスの葯培養におけるカルス形成率 (カルス形成した葯の割合) や胚様体形成率の季節的変動に関しては、低温期に母本株から花蕾を採取することが有効であると報告されている<sup>2)</sup>。今回の試験においても25/15℃の方が35/25℃より胚様体形成率が高い結果となったことから、母本株は、高温条件にならないことが重要であると考えられた。また、花蕾採取する時期としては、開花初期から18日後が最も胚様体形成率が高く、以後低下した。この低下の原因として母本株の草勢低下が考えられたので、追肥や整枝等の草勢維持管理を実施したが胚様体形成率は回復しなかった。高い胚様体形成率を維持していくためには母本株の栽培条件を今後検討していく必要がある。



第1図 母本株の栽培温度の違いが胚様体形成率に及ぼす影響

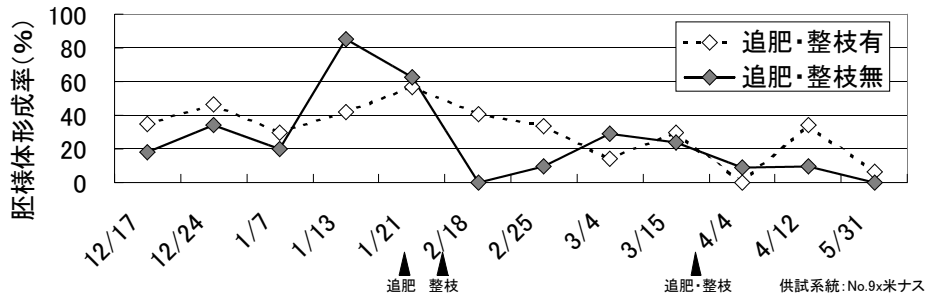
注) 棒上の数字: 置床葯数



第2図 花蕾採取時期の違いが胚様体形成率に及ぼす影響

注) 各区置床葯数: 23~58

56日目・25/15℃・米ナス区では、採取花蕾無し。

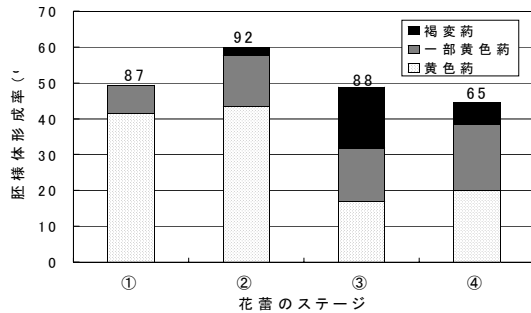


第3図 母本株の草勢の違いが胚様体形成率に及ぼす影響

注) 各区置床薬数: 23~66、但し2/18と5/31の追肥・整枝無区は、採取花蕾無し。

## 2 採取する花蕾のステージ

対照であるがく先が開く直前より早い②で最も胚様体形成率が高かった。②よりも早い①は黄色部を維持した葯の割合が最も高かったが、胚様体形成率は対照とほぼ同程度であった(第4図)。②の時期は、がく先が開く前で、花蕾の大きさでいうと、花蕾の太さが8mm 台、長さが22mm 程度になる。



第4図 花蕾ステージの違いが胚様体形成率に及ぼす影響

注) 棒上の数字: 置床薬数、供試系統: No. 9x米ナス

花蕾のステージ: ③(がく先が開く直前)を対照として、③より前を①②、③より後を④(詳しくは第1表参照)

## 3 花蕾の5℃・暗黒条件期間

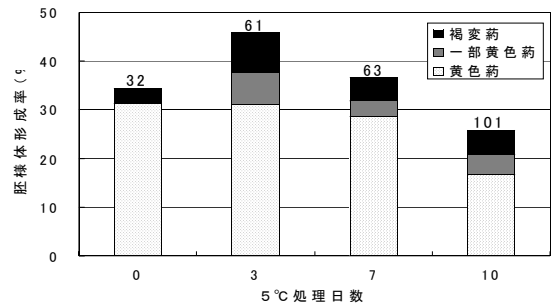
対照の10日間よりも短い処理で胚様体形成率が高くなった。特に3日間で最も高くなったが、黄色部を維持した葯の胚様体形成率は0、3、7日間で大きな差は認められなかった(第5図)。

葯培養前の花蕾の低温処理がカルス形成率に対して阻害的に働いた報告<sup>3)</sup>がある。今回の胚様体形成率に対しては0日間と比べ10日間は阻害的に働いたが、3日間では逆に促進的に働いた。

## 4 葯の35℃・暗黒条件期間

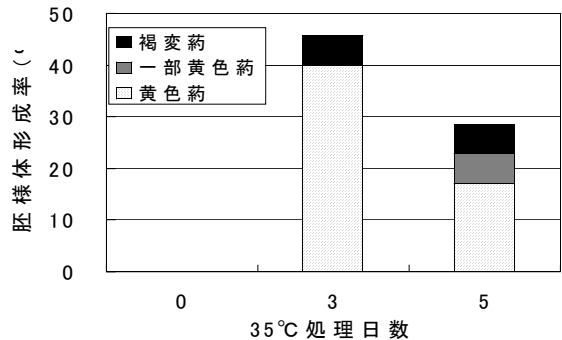
対照の3日間で胚様体形成率が最も高かった(第6図)。

葯培養において高温処理がカルスや胚様体形成を促進することが多くの植物種で確認されている。ナスにおいても効果が認められているが<sup>3)</sup>、今回の実験でも効果が認められた。



第5図 5℃処理期間の違いが胚様体形成率に及ぼす影響

注) 棒上の数字: 置床薬数、供試系統: No. 9x米ナス



第6図 35℃処理期間の違いが胚様体形成率に及ぼす影響

注) 各区置床薬数: 35、供試系統: No. 9x米ナス

## 5 胚様体誘導培地条件

### 1) 硝酸銀添加

対照の硝酸銀無添加培地ではほとんどの葯が褐色し

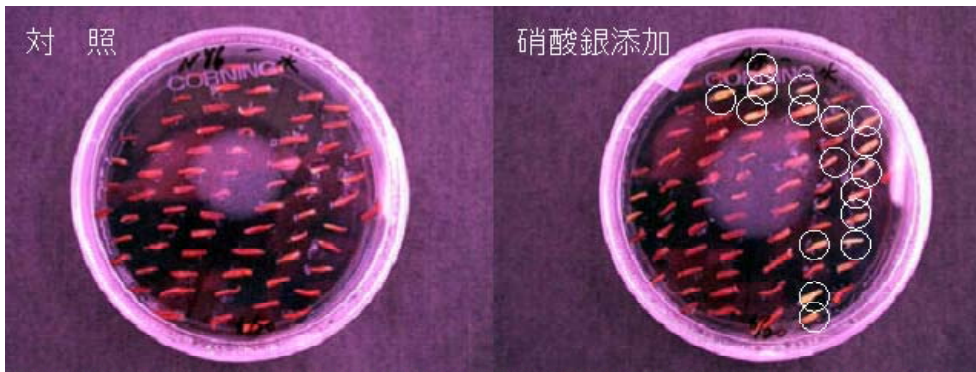
たのに対し、硝酸銀を10mg/l 添加した培地では“米ナス”で27%、“No. 9”×“米ナス”で38%の薬が黄色部を維持した。また、対照では胚様体形成が認められなかったのに対し、硝酸銀を添加した培地では“米ナス”で17%、“No. 9”×“米ナス”で19%の薬で胚

様体が形成された（第2表、第7図）。

硝酸銀はエチレン活性阻害剤として知られている<sup>4)</sup>が、胚様体誘導培地に添加することによって、薬の褐変を抑制することにより胚様体形成率が向上したと考えられる。

第2表 硝酸銀添加が薬の状態及び胚様体形成率に及ぼす影響

系統名	培地	薬の色				黄色薬割合(%)	胚様体形成率(%)
		黄色	一部黄色	褐色	計		
米ナス	対照	0	1	93	94	1.1	0
	硝酸銀添加	11	12	63	86	26.7	17.4
No. 9x米ナス	対照	0	0	77	77	0.0	0
	硝酸銀添加	7	31	63	101	37.6	18.8



第7図 薬の褐変状況（胚様体誘導培地に置床後20日目）

注) ○は、黄色部を維持した薬

2) ショ糖濃度

胚様体誘導培地のショ糖濃度を対照の3%から高めることにより、“No. 9”×“米ナス”では胚様体形成率が向上した。特に7%での効果が高かった。しかし、“米ナス”は濃度を高めても胚様体形成は認められなかった（第4表）。

ショ糖濃度については、これまで3%が一般的だったのに対して“No. 9”×“米ナス”では7%が最も効果が高かった。

第3表 ショ糖濃度の違いが胚様体形成率に及ぼす影響

系統名	ショ糖濃度	置床薬数	胚様体形成率(%)
米ナス	3%	22	0
	7%	20	0
	10%	19	0
No. 9x米ナス	3%	56	26.8(±1.96)
	7%	54	38.9(±4.37)
	10%	56	21.4(±9.43)

3) L-グルタミン添加

胚様体誘導培地への L-グルタミンの添加による胚様体形成率への影響は認められなかった（第3表）。

ナタネの単離花粉培養において胚発生誘導時にはグル

タミンが必要であることや、メロンの偽受精胚珠培養における半数体獲得率向上にグルタミンが効果があることが報告されている<sup>5)6)</sup>。そこで、ナス薬培養においても、胚様体誘導でのグルタミンの効果を検討したが、効果は判然としなかった。薬の植付日により効果がかかなり変動しているの、薬の栄養状態等の影響が大きいのではないかと考えられた。

第4表 L-グルタミン添加が胚様体形成率に及ぼす影響

系統名	植付日	培地	植付薬数	胚様体形成率
米ナス	4/26	対照	11	0.0
		L-グルタミン添加	10	0.0
	5/21	対照	72	—
		L-グルタミン添加	72	—
	6/7	対照	47	0.0
		L-グルタミン添加	46	19.6
7/18	対照	43	2.3	
	L-グルタミン添加	44	0.0	
No. 9x米ナス	4/26	対照	21	0.0
		L-グルタミン添加	19	10.5
	5/21	対照	60	—
		L-グルタミン添加	60	—
	6/7	対照	26	0.0
		L-グルタミン添加	26	3.8
	7/18	対照	40	15.0
		L-グルタミン添加	42	2.4
	9/3	対照	25	4.0
		L-グルタミン添加	25	8.0

#### IV 引用文献

- 1) MURASHIGE, T. and F. SKOOG, *Physiol. Plant.* 15 : 473-487, 1962
- 2) 松原幸子・徳毛謙治・村上賢治 : *園学雑* 62 別1, 196-197, 1993
- 3) 徳毛謙治・村上賢治・松原幸子 : *岡山大学農学部学術報告* 84, 13-16, 1995
- 4) PURNHAUSER, L., P. MEDGYESY, M. CZAKÓ, P. J. DIX and L. MÁRTON, *Plant Cell Reports* 6:1-4, 1987
- 5) 大川安信・福岡浩之・小川泰一 : *育学雑* 44 別, 233, 1994
- 6) 小川理恵・大藪哲也・青山香 : *愛知農総試研報* 34, 61-66, 2002

#### Summary

##### Embroid Formation from Eggplant Microspores by Anther Culture

Makoto SARUWATARI and Kazuhiko IIMURE

Effective methods for the production of embryoids by culturing anthers of eggplant cv. 'Beinasu' and crossing lines of Kumamoto-naganasu lines and 'Beinasu' were studied.

1. By using flower buds taken from relatively young plants (18th day from the beginning of flowering day) under 25 °C day/ 20 °C night condition rather than 35 °C day/25 °C night condition, Embroids were formed at high frequency.
2. The most effective size of flower buds in embryos formation were between 22mm and 23mm in length and between 8mm and 9 mm in thickness when ahead of the calyces are not open.
3. High embryoid formation rate were obtained by incubation of flower buds at 5°C for 3 days in dark condition before the anthers were inoculated on the embryoid induction medium or by anther culture at 35°C for first 3 days in dark condition on the embryoid induction medium.
4. By adding sucrose to 7% when crossing lines of Kumamoto-naganasu lines and 'Beinasu' are used or by supplying AgNO<sub>3</sub> to 10mg/l, embryoids were formed at high frequency.

Key words : egg plant, anther culture, embryoid, haploid