

ナス小胞子からの植物体再生率の向上

佐伯由美*・内村要介・中原隆夫

ナスの育種年限短縮を目的とした小胞子からの半数体倍加系統の作出において、植物体再生率を向上させる改良法を以下のように確立した。

- 1 小胞子からのカルス形成には、2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2, 4-D) 0.4mg/ℓ, ベンジルアデニン (BA) 0.2mg/ℓ, ショ糖 2% を添加した NLN 液体培地 (pH5.8) を用いる。
- 2 葉原基の分化には、zeatin 2 mg/ℓ, インドール酢酸 (IAA) 0.2mg/ℓ を添加した mNLN 寒天培地 (ショ糖 1%, 寒天 1%, pH5.8) を用いる。
- 3 シュートの形成には、植物生長調節物質無添加の mNLN 寒天培地を用いる。
- 4 発根には、インドール酪酸 (IBA) 0.1mg/ℓ 添加の 1/2 mNLN 培地 (ショ糖 1%, 寒天 1%, pH5.8) を用いる。
- 5 改良した培養法は、従来の培養法と比較して、カルスからの植物体再生率が70%に向上し、一般的な栽培品種「千両二号」, 「筑陽」, 「博多長なす」にも適応できた。

[キーワード: ナス, 小胞子培養, カルス, 植物体再生, 半数体]

A Study for Increased Rates in Plant regeneration from Eggplant (*Solanum melongena* L.) microspores. SAIKI Yumi, Yosuke UCHIMURA and Takao NAKAHARA

(Fukuoka Agricultural Research Center, Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan) *Bull. Fukuoka. Agric. Res. Cent.* 28:17-22(2009)

We made improvements to the protocol for plant regeneration from microspores of eggplant.

1. Microspore induced calli were incubated on a modified NLN medium (mNLN) with addition of 0.4mg/ℓ 2,4-D, 0.2mg/ℓ BA and 2% sucrose at pH 5.8.
2. Calli induced leaf primordia were incubated on mNLN agar medium with 1% sucrose and 1% Agar at pH5.8 with addition of 2 mg/ℓ zeatin and 0.2 mg/ℓ IAA.
3. The leaf primordiums induced shoots were incubated on mNLN agar medium with 1% sucrose and 1% Agar at pH5.8.
4. For rhizogenesis, mNLN agar medium containing a half of inorganic nutrient was used, 1% sucrose and 1% Agar at pH5.8 with addition of 0.1mg/ℓ IBA.
5. This improved method proved to increase the rate of plant regeneration from calli up to 70%. This protocol proved applicable to Japanese commercial eggplant cultivars such as 'Senryou 2 gou', 'Chikuyou' and 'Hakata naganasu' with the same favorable results.

[Key words : eggplant, microspore culture, callus, plant regeneration, haploid]

緒 言

福岡県のナスは、野菜の生産額第 2 位を占める重要作目である (福岡県農業白書, 平成19年度)。しかし、ナスの価格低迷、生産者の高齢化など、産地を取り巻く環境は厳しい。このような状況下、産地を振興するための有効な方策の一つとして、省力で低コスト栽培が可能な優良品種の早期育成が求められている。品種の早期育成を可能とする方法の一つに、半数体育種法がある。半数体育種法は、交配により得られた雑種第一代 (F₁) の様々な遺伝子型を持つ配偶子の半数性細胞から半数体を作成し、その染色体を倍加処理することで、直ちに形質が遺伝的に固定した純系を作成できる。それらの純系から目的形質を持つ個体を選抜することで、形質の固定期間を短縮し、早期の品種育成を可能とする方法である。イネの交雑育種では、従来は世代促進を 2 回行っても生産力検定予備試験まで 3~4 年必要であるが、薬培養では 2 年に短縮した (大里 2001)。ビール大麦のバルボッサム法では、

交配 2 年目から生産力検定予備試験が可能となり、醸造品質が優れる「ほうしゅん」が育成された (古庄ら 1999)。

ナスとナス台木の半数体作出については、薬培養 (Matsubara ら 1992, 瀧川ら 1992, 岡田ら 1993, 猿渡ら 2005) と小胞子培養 (Miyoshi 1996, 高田ら 2006) の 2 つの方法が報告されている。薬培養は、未熟花粉粒を含む薬を置床して培養する方法である。この方法を利用して、ナス台木品種「台二郎」 (岡田ら 2002), ナス品種「土佐鷹」 (岡田ら 2007) が育成されている。一方、小胞子培養は、直接、未熟花粉を培養する方法である。小胞子培養の利点は、大きさ $\phi 20 \mu\text{m}$ 程度の単細胞を培養対象とするため、薬培養に比較して、より小さなスペースで培養できること、薬壁等の体細胞を分離除去することで、再生した植物体は全て小胞子由来の半数体、または倍加半数体になることである。しかしながら、ナス、ナス台木の小胞子培養については、それぞれ、Miyoshi (1996) と高田ら (2006) の報告のみである。

Miyoshi (1996) は、ナスの小胞子から植物体を再生させるために、単離した小胞子について、35℃, 3 日間の高温処理が必要なこと、カルス形成に適する

*連絡責任者

(バイオテクノロジー部: ysaiki@farc.pref.fukuoka.jp)

ショ糖濃度が2%であることなどを、初めて明らかとした。しかしながら、残された問題として、カルスからの植物体再生率が0.1~2%と低いことを挙げている。

カルスからの植物体再生率が低い原因として、培地条件が適していないことが考えられる。Miyoshi (1996) は小孢子由来カルスからのシュート形成に、ショ糖2%, 寒天0.8%, pH5.8, zeatin 4.0mg/ℓとIAA 0.2mg/ℓを添加したMS培地 (Murashige and Skoog 1962) を用いている。筆者らは、この条件で、単為結果性ナス系統「AE-P08」, 「AE-P11」の小孢子を培養したところ、カルスから葉原基は分化したが、シュートの形成率は0.5%以下と低かった。また、カルスが培養中に褐変し、分化した葉原基は肥大、ガラス化したり、再度カルス化した。これらのことから、シュート形成率を向上させるための基本培地、ショ糖濃度および植物生長調節物質の濃度の改良が必要であると考えられた。

そこで本試験では、ナスの小孢子からの植物体再生率の向上を目的に、小孢子からのカルス形成、カルスからの葉原基の分化、葉原基からのシュート形成およびシュートからの発根に適する培地条件の検討を行った。

材料および方法

供試材料として、ナス (*Solanum melongena* L.) の単為結果性系統「AE-P08」と「AE-P11」(独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 野菜茶業研究所育成) を用いた。昼温28℃/16時間、夜温18℃/8時間、8,000luxに設定した人工気象器 (小糸工業株式会社製コイトロンFR特殊型) で栽培した各系統3株から、がく片から花弁の先端が見える程度の花蕾 (長さ7mm程度) を採取し、葯を実験に供試した。供試した葯は、クリーム色から黄緑色であり、一核期~二核期の生育ステージの小孢子を含むと考えられた (瀧川 1992, Miyoshi 1996, 猿渡 2005)。小孢子の単離は高田ら (2006) の方法に準じ、パーコール密度40%と60%の境界層より単離し、実験に供試した。

1 小孢子からのカルス形成

基本培地について、NLN培地 (Lichter 1981), 1/2 NN培地 (Nitsch and Nitsch 1967), KM 8 p培地 (Kao and Michayluk 1975) および多量要素を1/2にしたMS培地 (1/2MS) の4種類について検討した。各培地には、すべてショ糖2%, 2, 4-D 0.4mg/ℓおよびBA 0.2mg/ℓを添加し、pH5.8に調整後、ろ過滅菌した。小孢子は、Miyoshi (1996) に準じて小孢子密度 3×10^5 個/ℓとなるように懸濁し、直径35mmのプラスチックシャーレに2mlずつ分注後、25℃、暗黒条件下で培養した。4週間後、形成されたカルス数を調査した。実験は5反復行った。

次に、植物生長調節物質の種類と濃度について、オーキシン類は2, 4-D, NAAおよびIAAの3種類を供試し、濃度は0.2, 0.4, 0.8, 1.0mg/ℓの4水準を検討した。サイトカイニン類はBAとKinetin

の2種類を供試し、濃度は0.2mg/ℓの1水準を検討した。基本培地をNLN培地とし、オーキシン類とサイトカイニン類の処理区をすべて組み合わせた合計24種類の培地に、小孢子を 3×10^5 個/ℓで懸濁し、24穴 (直径16mm) のIWAKI MICROPLATE に500μℓずつ分注後、基本培地の検討と同様に培養した。4週間後、形成されたカルス数を調査した。実験は4反復行った。

2 葉原基の分化

カルスからの葉原基分化に適するショ糖濃度については、1%と2%の2水準で検討した。各濃度のショ糖は、MS培地 (寒天1%, pH5.8) にzeatin 4.0mg/ℓとIAA 0.2mg/ℓとともに添加し、直径60mmのプラスチックシャーレに10mlずつ分注した。各培地に、小孢子から形成された2mm程度のカルスを置床し、3週間ごとに3回継代し、6,000lux, 16時間明期、25℃条件下で培養した。9週間後、葉原基の分化数と率を調査した。実験は1区につき、カルス8個を供試し、2反復行った。

次に、基本培地については、NLN培地の多量要素をB5 (Gamborg ら 1968) に変更したmNLN培地とMS培地を検討した。いずれの培地も、zeatin 4.0mg/ℓ, IAA 0.2mg/ℓ, ショ糖1%, 寒天1%を添加し、直径60mmのプラスチックシャーレに10mlずつ分注して、同様に培養した。9週間後、葉原基の分化数と率を調査した。実験は1区につきカルス8~16個を供試し、3反復行った。

さらに、zeatinの濃度については、0.4, 2.0, 4.0mg/ℓの3水準で検討した。いずれもNLN培地 (ショ糖1%, 寒天1%, pH5.8) にIAA 0.2mg/ℓとともに添加し、直径60mmのプラスチックシャーレに10mlずつ分注し、同様に培養した。9週間後、葉原基の分化数と率を調査した。実験は1区につきカルス79個を供試した。

3 シュート形成

葉原基分化率の高かったzeatin 2.0, 4.0mg/ℓを添加したmNLN培地 (IAA 0.2mg/ℓ, ショ糖1%, 寒天1%, pH5.8) で培養したカルスを用い、シュート形成に適するzeatin, IAA, ジベレリン (GA_3) の効果を検討した。zeatin濃度は2.0, 4.0mg/ℓ, IAAと GA_3 の濃度は0.2mg/ℓで検討した。これらの植物生長調節物質は、mNLN培地 (ショ糖1%, 寒天1%, pH5.8) に添加した。各培地は、10×10×10cmの培養容器 (Magenta社製 vessel GA-7) に40mlずつ分注し、葉原基が分化したカルスを前記の培地に3~4個ずつ置床し、3週間ごと、2回継代した。6週間後、シュート形成数と率を調査した。実験は、1区につきカルス13~24個を供試した。

4 シュートからの発根

植物生長調節物質について、NAAとIBAを検討した。予備検討の結果から、基本培地にはmNLN培地より発根率の優れた、mNLN培地の多量要素を半分

に改変した1/2mNLN 培地を用いた。

植物生長調節物質は、1/2mNLN 培地（ショ糖 1%，寒天 1%，pH5.8）に各 0.1mg/ℓ を添加し、10×10×10cm の培養容器（Magenta 社製 vessel GA-7）に40mlずつ分注した。0.5～1.0cm 程度に伸長したシュートを各培地に挿し、2週間後に発根率を調査した。実験は、1区20本行った。

5 再生した植物体の倍数性と他品種への適応性

本研究の結果を基に確立した小胞子培養の改良法（第2図）を適応して再生した植物体について、79個のカルスから各1つずつ再生した植物体79個体を用い、葉を5×5mmの大きさに切り取り、フローサイトメーター（Partec 社製 Ploidy Analyzer PA 型）で倍数性を測定した（Galbraith 1983）。さらに、他品種への適応性を検討するため、10号鉢に1本栽植し、ガラス室で育成した栽培品種の「千両二号」、「筑陽」および「博多長なす」を用い、改良した小胞子培養（第2図）を行った。2008年6月と7月に1回ずつ、各品種3本から蕾を採種し、実験に供試した。なお、実験精度の確認を目的に、改良法の検討の際と同様にして栽培した「AE-P11」を栽培品種と同様に供試した。

結 果

1 小胞子からのカルス形成

4種類の基本培地における、小胞子3×10⁵個/㎖当たりのカルス形成数を第1表に示した。NLN 培地では6.8個、KM8p 培地では2.5個、1/2NN 培地では2.4個、1/2MS 培地では0個であり、カルス形成数は1/2MS 培地より NLN 培地が優れた。KM8p 培地と1/2NN 培地のカルス形成数は、両培地の中間に位置し、それぞれに対し、有意差はなかった。

第1表 基本培地が小胞子からのカルス形成に及ぼす影響

基本培地	カルス形成数 ¹⁾
NLN	6.8 ± 2.9 a ²⁾
KM8p	2.5 ± 2.7 ab
1/2NN	2.4 ± 5.3 ab
1/2MS	0.0 ± 0.0 b

1) カルス形成数は小胞子3×10⁵個/㎖当たり、平均±標準偏差。

2) 異文字間は、5%水準で有意差あり（Steel-Dwass検定）。

次に、植物生長調節物質の3種類のオーキシン類、すなわち2, 4-D, NAA, IAA それぞれ濃度4水準および2種類のサイトカイニン類、BA と kinetin を組

み合わせた24種類の培地で形成されたカルス数について分散分析した結果を第2表に示した。その結果、オーキシンの種類に1%水準、濃度に10%水準で有意差が認められ、オーキシンの種類とサイトカイニンの種類の間に交互作用が認められた。そこで、オーキシンとサイトカイニンの各組合せと得られたカルス数を第3表に示した。その結果、2, 4-D と BA の組合せが22.7個と最も多くカルスを形成し、NAA と Kinetin, IAA と BA および kinetin の組合せと比較して5%水準で有意差が認められた。また、2, 4-D と kinetin, NAA と BA との間に有意差は認められなかった。2, 4-D と BA の組合せについて、2, 4-D の各濃度から形成されたカルス数は2, 4-D 0.2mg/ℓ で22.8±14.3個、0.4mg/ℓ で28.2±14.2個、0.8mg/ℓ で24.8±14.4個、1.0mg/ℓ で15.0±8.5個であり、0.4mg/ℓ で最大となったが有意差は認められなかった。

第3表 植物生長調節物質の種類が小胞子からのカルス形成に及ぼす影響

植物生長調節物質		形成カルス数(個/㎖) ³⁾
オーキシン類 ¹⁾	サイトカイニン類 ²⁾	
2, 4-D	BA	22.7 ± 12.8 a ³⁾
	Kinetin	15.3 ± 12.4 abc
NAA	BA	16.5 ± 10.8 ab
	Kinetin	11.1 ± 11.2 bc
IAA	BA	2.8 ± 4.4 d
	Kinetin	5.7 ± 13.2 d

1) 各オーキシン類は、0.2～1.0mg/ℓ 添加した。

2) サイトカイニン類は、各培地に0.2mg/ℓ 添加した。

3) 平均値±標準偏差。

4) 異文字間は5%水準で有意差あり（Steel-Dwass検定）。

2 葉原基の分化

葉原基分化率は、ショ糖1%区では31%であり、ショ糖2%区の6%より優れた（データ略）。

次に、mNLN 培地と MS 培地での、葉原基分化率を第1図に示した。mNLN 培地が78%で、MS 培地の

第4表 zeatin 濃度が葉原基の分化に及ぼす影響

zeatin濃度	培養カルス数	葉原基を分化した	
(mg/ℓ)	(A)	数 (B)	率 (B/A%)
0.4	79	30	38 b ¹⁾
2.0	79	42	53 a
4.0	79	47	59 a

1) 異文字間は、5%水準で有意差あり（χ²検定）。

第2表 小胞子からのカルス形成におけるオーキシン類とサイトカイニン類を要因とした分散分析

要 因	変動	自由度	分散	分散比	P値
オーキシンの種類 (A)	5358.4	2	2679.2	20.6	<0.0001 **
濃度 (B)	923.9	3	308.0	2.4	0.0735 †
サイトカイニンの種類 (C)	390.6	1	2.3	0.0	0.8946
(A) × (B)	451.8	6	75.3	0.6	0.7457
(A) × (C)	720.9	2	360.4	2.8	0.0661 †
(B) × (C)	409.4	3	136.5	1.1	0.3725
誤差	16357.4	126	129.8		
合計	24612.3	143			

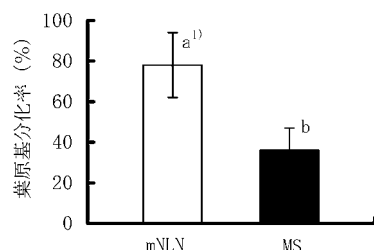
1) **: 1%水準, †: 10%水準で有意差あり

第5表 植物生長調節物質がシュート形成に及ぼす影響

供試カルスの由来	シュート形成培地の植物生長調節物質 (mg/ℓ)			培養カルス数	シュート形成カルス	
zeatin (mg/ℓ)	zeatin	IAA	GA ₃	(A)	数 (B)	率 (B/A%)
2.0	0.0	0.0	0.0	14	10	71 a ²⁾
	0.0	0.0	0.2	14	8	57 b
	2.0	0.2	0.0	24	10	42 b
4.0	0.0	0.0	0.0	13	7	54 b
	0.0	0.0	0.2	14	2	14 c
	4.0	0.2	0.0	21	3	14 c

1) 供試カルスは、各zeatin濃度にIAA 0.2mg/ℓを添加した葉原基分化培地で培養したもの。

2) 供試カルスの異文字間は5%水準で有意差あり (χ²検定)。



第1図 葉原基の文化に及ぼす基本培地の影響

1) 異文字間は、5%水準で有意差あり (t検定)

第6表 植物生長調節物質がシュートからの発根に及ぼす影響

植物生長調節物質	供試数	発根個体数	発根率 (%)
無添加	20	6	30 b ¹⁾
NAA 0.1mg/ℓ	20	2	10 b
IBA 0.1mg/ℓ	20	13	65 a

1) 異文字間は5%水準で有意差あり (χ²検定)。

36%に比較して、有意に優れた。

さらに、zeatin 0.4, 2.0, 4.0mg/ℓの3水準における、葉原基分化数と率を第4表に示した。zeatin 2.0mg/ℓと4.0mg/ℓにおける葉原基分化率は53%と59%であり、zeatin 0.4mg/ℓの38%より有意に優れた。

3 シュート形成

形成された葉原基からシュートを形成させるため、植物生長調節物質の種類と濃度を検討した結果を第5表に示した。供試カルスの由来では、zeatin濃度2.0mg/ℓの方が4.0mg/ℓよりもシュート形成率が高い傾向が認められ、中でも、植物生長調節物質無添加培地へ継代した試験区が71%と特に優れた。

4 シュートからの発根

NAAとIBAを各0.1mg/ℓを添加した1/2mNLN培地における、シュートからの発根率を第6表に示した。発根率はIBA 0.1mg/ℓが65%で、無添加区およびNAA 0.1mg/ℓ処理区より有意に優れた。

5 再生した植物体の倍数性と他品種への適応性

フローサイトメーターにより倍数性を調査した結果を第7表に示した。半数体が11%、二倍体が70%、三倍体が3%、四倍体が11%、残り5%はキメラであった。

また、小胞子培養の改良法(第2図)を他品種へ適応した結果を第8表に示した。3×10⁵個/mlの小胞子

第7表 小胞子から再生した植物体の倍数性

倍数性	個体数
半数体	9(11)
二倍体	56(70)
三倍体	2(3)
四倍体	9(11)
キメラ	4(5)
計	79(100)

()内は%

第8表 ナス品種の小胞子からの植物体再生

品種	小胞子3×10 ⁵ 個からの再生植物体数	小胞子からの再生率(×10 ⁻³ %)	葯当たりの再生植物体数
千両二号	14.2	4.7	3.6
筑陽	9.2	3.0	2.3
博多長なす	4.1	1.3	1.0

1) 小胞子3×10⁵個は、葯4個量に相当する。

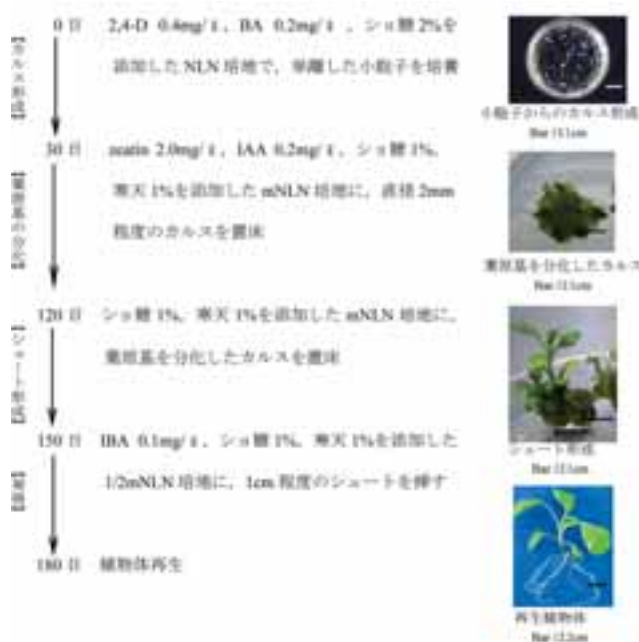
子から再生した植物体は、「千両二号」で14個体、「筑陽」で9個体、「博多長なす」で4個体であり、3品種の全てで再生植物体を得られた。また、「AE-P11」では6個体得られた(データ略)。

考 察

本研究では、小胞子からの植物体再生率を向上させるために、小胞子からのカルス形成、カルスからの葉原基の分化、シュート形成および発根に適する培地条件を検討し、さらに他品種への適応性を明らかにした。

ナス台木ヒラナス(*S. integrifolium*)をもちいて8種類の基本培地を検討した高田ら(2006)によると、Miyoshiがナス(*S. melongena* L.)で選定したNLN培地より1/2NN培地や1/2MS培地のカルス形成率が高かった。このため、今回、基本培地の適性を検討したが、結果としてMiyoshiの選定が適切であることが追認された(第1表)。これは、Nishioら(1987)と浅尾ら(1989)がナスの栽培種と台木を用いたプロトプラスト培養の例で示唆しているように、同じSolanum属であっても遺伝的な差異があるため、最適条件が異なることに起因するものと推察される。

一般的に、植物組織培養において、カルスを形成させるには、オーキシンとサイトカイニンを加える必要があり、その量は用いる植物種・品種により異なる。このため、小胞子からカルス形成に適する植物生長調節物質の種類と濃度を検討した結果、オーキシンの種類が最も強く影響を及ぼし、オーキシン濃度とサイト



第2図 ナス小胞子培養の改良法

カイニンとの組合せにも影響を受けることが明らかとなった(第2表)。2, 4-DとBA, 2, 4-Dとkinetin, NAAとBAの組合せがカルスの形成数が多く(第3表), NAAとBAを用いたMiyoshi(1996)の結果と同様であった。カルスには分化能が高いカルスと低いカルスがある。イネ科の植物では、視覚的な細胞選抜により、高い分化能をもつembryogenicなカルスの獲得に成功している(小関ら 2003)。一般的にembryogenicなカルスは黄白色であり細かい細胞塊となる傾向があり、分化能の低いカルスは液胞が多く肥大ぎみの傾向がある。Saitoら(1994)は、カルスの形態的な特徴を観察し、NAAよりも2, 4-Dの方がナスの子葉からembryogenicなカルスを多く形成させると報告している。そこで2, 4-DとBA, 2, 4-Dとkinetin, NAAとBAから得られたカルスを観察したところ、2, 4-Dとkinetinからのカルスにわずかな褐変が見られたが、形態に大きな違いは見られなかった。このため、検討した区なかで最もカルスを形成した2, 4-DとBAの組合せを採用し、葉原基分化の検討に用いたが、2, 4-Dとkinetin, NAAとBAからの葉原基分化率は未調査であるため、今後の課題として残された。

Miyoshi(1996)の報告では、ナスの小胞子培養において、カルスからのシュート形成率が0.1~2%と低い点を問題として挙げている。Miyoshi(1996)が示した葉原基を分化させる培養条件で連続培養すると、シュートを形成せず、再度カルス化したり、葉原基を形成し続ける傾向が観察された。今回、zeatin 2.0mg/lを添加したmNLN培地で葉原基を分化させた後、植物生長調節物質無添加培地へ継代することにより、シュート形成率は約70%と飛躍的に向上した(第5表)。このことから、植物生長調節物質を長期間供給することがシュート形成を抑制していると推察され、葉原基分化後は、分化組織に対する植物生長調節物質

の供給を絶つことがシュート形成率の向上に有効に作用すると考えられた。

Miyoshi(1996)は染色体数による倍数性の確認を、無作為に選んだ12個体の植物体について行った結果、半数体は1個体(8.3%)、二倍体は7個体(58.3%)、三倍体は3個体(25%)、四倍体は1個体(8.3%)であると報告している。また、高田ら(2006)は、ヒラナス小胞子からの再生植物体の倍数性をフローサイトメーターを用いた測定で調査した結果、半数体2.2%、二倍体49.3%、三倍体32.8%、四倍体14.8%であったと報告している。筆者らが再生させた植物体の倍数性も、Miyoshi(1996)と高田ら(2006)の報告と同様の傾向で、半数体が11%、二倍体が70%であり(第7表)、二倍体が最も多かった。今回の小胞子培養は、パーコールの密度勾配遠心分離により、葯壁由来の体細胞を除去していることから、再生個体で確認される二倍体は自然倍加半数体であると考えられる。このため、再生した植物体のうち、約70%はコルヒチン等による染色体倍加処理の必要がなく、半数体と合わせ、再生植物体の約80%が育種材料として利用できると推察される。しかし、自然倍加とは考えられない三倍体も少数ながら得られた。三倍体の出現は、ナスの他に、pakchoi(Mingら1994)の小胞子培養やhot pepper(Supenaら2006)の葯培養でも確認されている。一般的に、植物細胞の培養において、様々な倍数体が見られる原因は、減数分裂の異常と考えられている。新関(1989)は、ツクバネアサガオやアメリカチョウセンアサガオの葯培養で頻繁に三倍体が再生する理由を、紡錘糸の融合がおこっているため、核内重複した生殖核と栄養核が共通の紡錘体上で分裂し、2つの三倍性の娘核をつくるためであると説明している。今回、小胞子培養の改良法から再生する三倍体は遺伝的に固定された同質倍数体と推定され、再生個体数も少ないため、純系獲得手法として問題はないと考えられる。また、三倍体はその特徴である完全不稔性を利用し、果物の無核性の付加に利用されており、今回再生した三倍体も無核品種育成への利用が考えられる。ナスの未熟種子周辺の果肉は褐変しやすく、外食産業や加工産業上問題となっているため、無核性である三倍体は褐変低減による品質向上が期待できる。また、四倍体は二倍体との交配により三倍体が作出できることから、種なしF1品種育成へ利用可能であると考えられる。

今回、改良した小胞子培養法は、「千両二号」、「筑陽」および「博多長なす」の3品種いずれも再生植物体が見られた(第8表)。一般的に植物の葯や小胞子からの植物体再生率には、品種間差があることが知られているが(岡田ら1993, 釘貫2001, ZoeKernan and Ferrie 2006)、改良した小胞子培養法は、様々な品種に適応できる可能性が示唆された。

葯培養での植物体再生率について、岡田ら(1993)は培養60日後の不定胚形成率が0~3.2%(葯当たり0~0.03個)、猿渡ら(2005)は胚様体形成率が10~20%(葯当たり0.1~0.2個)であったと報告している。今回、改良した小胞子培養方法は、1葯当たりに換算

すると1～4個体の再生植物体が得られた(第8表)。このことから、改良した小孢子培養法は、葯培養と比較しても効率的に純系を獲得できる方法と考えられる。

残された問題点は、小孢子の単離から植物体の再生まで約180日間を要することである。葯培養(岡田ら1993, 猿渡ら2005)およびナス台木の小孢子培養(高田ら2006)の約60日と比較すると長く、育種に利用するためには、再生期間の短縮が今後の課題である。

半数性単細胞である小孢子の培養は、新規な形質を付与できるイオンビームを用いた突然変異育種法において、照射深度が1mm程度と浅いイオンビーム(岡村2002, 森下2003)を確実に照射できる利点がある。また、葯や種子などと比べ、一度に多数の個体に照射できること、生じた劣性の突然変異をコルヒチン等により倍加することで、照射当代で変異を固定し、評価できる特徴を持つ。今後、新しい形質を備えた品種育成と育種年限の短縮に役立つと考えられる。

引用文献

- 浅尾浩史・谷川元一・荒井 滋・小島博文(1989)栽培ナスおよび近縁野生種の葉肉プロトプラストからの植物体再生. 奈良農試研報 **20**: 73-78.
- 福岡県 (2008) 平成19年度 福岡県食料・農業・農村の動向 県農業白書.
- 古庄雅彦・馬場孝秀・山口 修・吉田智彦・濱地勇次・吉川 亮・水田一枝・吉野 稔(1999)ビール大麦新品種‘ほうしゅん’の育成. 福岡農総試研報 **18**: 26-31.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res **50**: 151-158.
- Galbraith DW, Harkins KR, Maddox JR, Ayres NM, Sharma DP, Firrozabady E (1983) Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. Science **220**: 1049-1051.
- Kao, K. N. and Michayluk, M. R. (1975) Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at very low population density in liquid media. Planta **126**: 105-110.
- 釘貫靖久(2001) Brassica 属野菜の根こぶ病抵抗性育種. 野菜試研報 **16**: 19-67.
- 小関良宏・小沢憲二郎(2003) 植物細胞工学入門 学術出版センター. Ⅲ-9 良い細胞系と悪い細胞系の見分け方. 58-61.
- Lichter, R (1981) Anther culture of *Brassica napus* in a liquid culture medium. Z. Pflanzenphysiol **103**: 229-237.
- Ming Q, Yan L, Fan L, Claire D (1994) Embryogenesis and plant regeneration of pakchoi (*Brassica rapa* L. spp. *chinensis*) via *in vitro* isolated microspore culture. Plant Cell Reports **13**: 447-450.
- Miyoshi, K. (1996) Callus induction and plantlet formation through culture of isolated microspores of eggplant (*Solanum melongena* L.). Plant Cell Reports **15**: 391-395.
- Matsubara, S. Kailin Hu and Kenji Murakami (1992) Embryoid and Callus Formation from Pollen Grains of Eggplant and Pepper by Anther Culture. J. Japan. Soc. Hort. Sci. **61**(1): 69-77.
- 森下敏和(2003) ソバ属植物の重イオン照射の生物効果. 育学研 **5** (別2): 56-59.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol plant **15**: 473-479.
- Nishio, T., T. Sato and K. Takayanagi (1987) Efficient plant regeneration from hypocotyl protoplasts in eggplant (*Solanum melongena* L. and *Solanum insanum* L.). Japan. J. Breed **37**: 389-396.
- Nitsch, C. and J. P. Nitsch (1967) The induction of flowering in vitro stem segment of plumbago indica L. I. The production of vegetative buds. Planta **72**: 355-370.
- 岡田昌久・猪野亜矢・松本満夫 (1993) 米ナス葯培養による植物体誘導. 高知農技セ研報 **2**: 41-44.
- 岡田昌久・吉田建実・新田益男・松本満夫(2002) ナス台木品種‘台二郎’の育成. 高知農技セ研報 **11**: 53-61.
- 岡田昌久・松本満夫・和田 敬・小松秀雄・高橋昭彦・橋本和泉・新田益男(2007) 促成栽培用ナス品種‘土佐鷹’の育成. 高知農技セ研報 **16**: 39-44.
- 岡村正愛(2002) イオンビーム育種の実用化. 放射線と産業 **95**: 57-63.
- 大里久美(2001) 水稻の良食味品種育成に関する研究. 福岡農試特研報 **16**.
- 猿渡 真・飯牟禮和彦・布目 司・福岡博之(2005) ナス葯培養における効率的な胚様体形成条件の検討. 九農研 **67**: 146.
- Saito T and S. Nishimura (1994) Improved culture conditions for somatic embryogenesis using an aseptic ventilative filter in eggplant (*Solanum melongena* L.). Plant Science **102**: 205-211.
- 新関宏夫(1989) 植物細胞組織培養 実際・応用・展望. 理工学社. 5章 葯・花粉培養: 217-272.
- Supena E. D. J, S. Suharsono, E. Jacobsen, J. B. M. Custers (2006) Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.) Plant Cell Reports 2006 Feb. **25**(1): 1-10.
- 高田衣子・佐伯由美・平島敬太・中原隆夫(2006) ナス台木ヒラナスにおける小孢子からの植物体の再生. 福岡農総試研報 **25**: 23-28.
- 瀧川尚子・三輪龍士・武田恭明・矢澤進(1992) 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** (3): 184-189.
- Zoekernan and A.M.R. Ferrie (2006) Microspore embryogenesis and the development of a double haploidy protocol for cow cockle (*Saponaria vaccaria*). Plant Cell Rep **25**: 274-280.