

ナス科野菜における雄性不稔系統の大量増殖法

長尾照義・別井弘始*

日本たばこ産業株式会社中央研究所

(〒252 横浜市緑区梅が丘6-2)

(1985年5月21日受付)

(1985年7月16日受理)

トマトおよびピーマンの雄性不稔系統を用いて、葉片と茎頂の外植片をLS培地に置床し、調節した環境条件下、*in vitro* で培養した。Indoleacetic acid (IAA) とサイトカイニンに対する外植片の生長および形態形成反応を種々の濃度の組み合わせで比較した。

両野菜の葉片とも、IAA とゼアチンの組み合わせは、IAA と 6-benzylaminopurine (6-BAP) またはカイネチンの組み合わせよりも苗条分化に効果が高かった。カルス上における多数の苗条分化は、トマトではゼアチン 1 mg/l、ピーマンでは 5 mg/l の単独添加培地で生じた。

これらの結果を踏まえて、茎頂由来または子葉由来の幼苗の大量増殖法を開発した。多数の再生植物を発根後、植木鉢に移植し、生長した植物での形態上の遺伝的変異を調べたところ、両野菜とも稔性回復の徴候がほとんど認められなかった。

1. 緒言

野菜の雄性不稔は、植物の機能不全の一現象と考えられ、栽培、育種上大きな障害となっている。しかし、雌性器官の形態および機能が正常で、雄性器官あるいは花粉のみが機能を失ったものでは、除雄・袋かけなどを省略して交配種子を得ることができるので、一代雑種の育種を容易に行いうることから、有用形質として注目されている。

遺伝的雄性不稔の遺伝様式は、(1) 核遺伝子だけが関係する場合、(2) 細胞質が関与する場合、(3) 細胞質と核遺伝子の相互作用がある場合に三大別される。

本研究は、前述の(1)および(2)の遺伝様式を示す雄性不稔系統の高効率な増殖技術を確立するため、ナス科野菜のトマトとピーマンの雄性不稔株の茎頂または葉片を用いて、苗の大量増殖法とその再生された野菜の遺伝的変異を検討したものである。

2. 材料および方法

(1) トマトの核遺伝子雄性不稔系統の増殖

農林水産省野菜試験場より提供された無雄ずい型雄性不稔トマト (*Lycopersicon esculentum*) の交配種 (slsl × SlSl) をは種して、開花後、不稔個体 (slsl) を選別した。その後、この個体を摘心して腋芽を4~5 cm に伸長させて

実験に供した。

まず、苗条再分化用の最適培地を選択するために、腋芽より伸長した若い葉片を表面殺菌後、約 5 mm 角に切断して、Linsmaier and Skoog (LS) 寒天培地を基本として各種濃度の IAA とゼアチン、6-BAP、またはカイネチンを組み合わせた培地に置床した。培養容器には高さ約 9 cm、直径 3 cm の円筒形のガラス瓶を用い、約 10 ml の培養液を注入した。各区平均10個体とした。培養条件は温度 27±1°C、白色蛍光灯下、照度約 1,500 lux、12時間照明に調節した。

また、大量増殖法の開発研究には、前述の腋芽を採取して表面殺菌後、その茎頂近傍組織を約 0.7~1.0 mm 摘出して、ゼアチンを含む LS 寒天培地に置床し、苗条原基¹⁾の形成状況を観察するとともに、苗条の大量増殖法を検討した。なお、再分化した苗条は発根させて4号鉢に移植し、生長開花後に形態上の遺伝的変異を調査した。

(2) ピーマンの細胞質雄性不稔系統の増殖

予備実験中に、ピーマンの本葉由来のカルスは、苗齢が経つにしたがって黒褐変し、植物体再分化能が低下する傾向を認めたので、試行錯誤の末、子葉の利用の有望であることがわかった。そこで、ピーマン (*Capsicum annuum*) の細胞質雄性不稔系統 (CMS 昌介) を植物ホルモン無添加の1/2無機塩 LS 寒天培地に無菌は種し、

* 現所属：厚生省薬務局

発芽後その子葉を採取して実験に供することにした。

まず、苗条再分化用の最適培地を選択するために、子葉を約 1~2 mm 幅に細刻し、それらの外植片を各種植物ホルモン濃度の培地に置床して検討した。供試個体数、培養条件等はトマトの場合とほぼ同様である。また、大量増殖法の開発研究にも子葉の細刻外植片を用いて研究を進めた。再分化した苗条は、発根後 4 号鉢に移植し、生長開花後に形態上の遺伝的変異を調査した。

3. 実験結果

(1) トマトの核遺伝子雄性不稔系統の増殖

1) 植物生長ホルモンと植物体再分化との関係

腋芽より伸長した若い葉片を用い、培地への植物ホルモン剤の添加効果を培養開始後、2 カ月目において調査した結果を **Fig. 1** に示した。葉もしくは苗条の再分化率は、ゼアチン 1~3 mg/l を添加した培地で高く、と

くに発根をともなる再分化率は、ゼアチン 1 mg/l、IAA 無添加の培地で最もよかった。IAA と 6-BAP およびカイネチンとの組み合わせでも再分化が認められたが、ゼアチンほどの効果が期待されなかった。

2) 大量増殖法の確立と遺伝的変異

腋芽の茎頂を用い、前述の器官の再分化率に効果の高かったゼアチン 1 mg/l の培地に着目し、それに IAA の 1 mg/l 添加と無添加の両区を作成し、茎頂 1 個当りの再分化苗条数を調査したところ、両区間に大差のないことが明らかになった(関係表略)。一方、苗条原基の形成後、原基を分割して、ゼアチン 0.2 mg/l と 1.0 mg/l 添加の両培地へ継代培養したところ、活着率および苗条発生率ともに前者がまさった。

以上の培養実験結果を踏まえて、茎頂の置床から鉢あげに至るまでの培養操作をまとめてみると、**Fig. 2** のよ

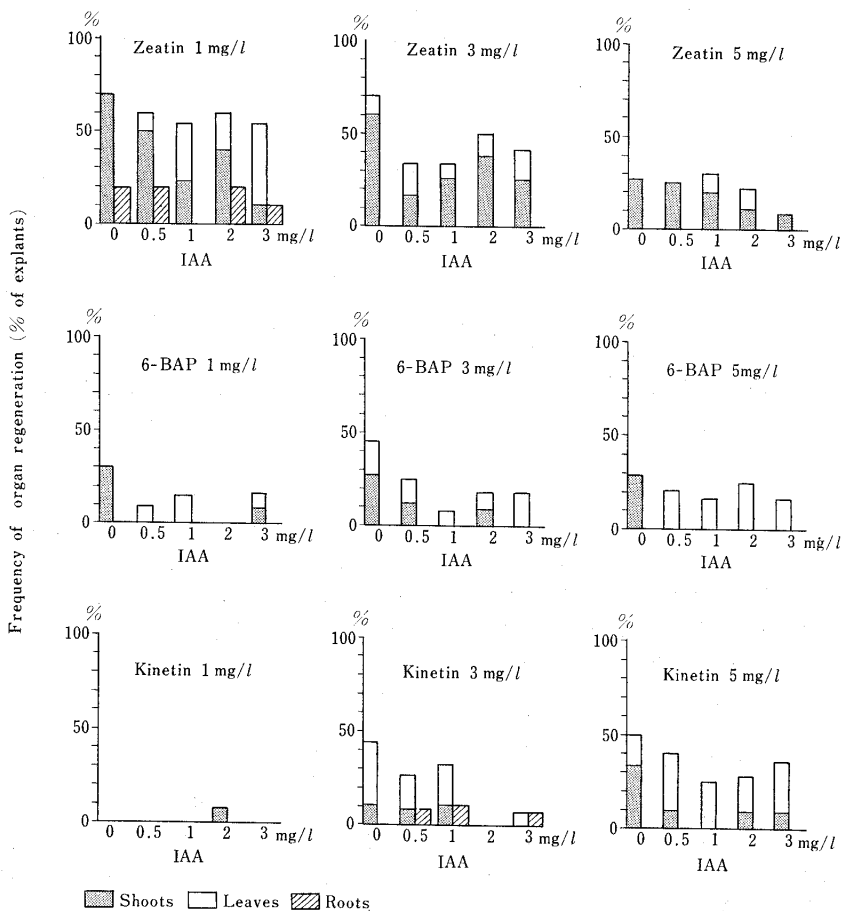


Fig. 1. Effects of phytohormones on the organ differentiation from leaf explants of a nuclear male sterile line of tomato.

Ten explants were tested for each hormone combination.

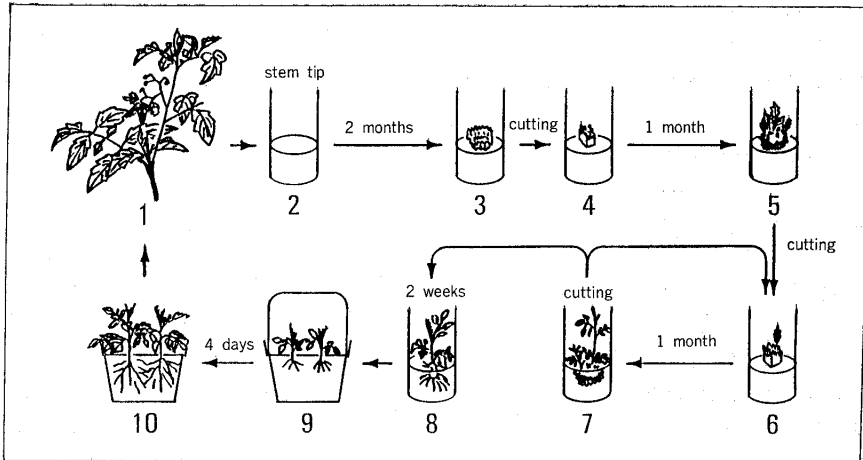


Fig. 2. Mass propagation system of a nuclear male sterile line of tomato. 1 : mother plant, 2 : stem tip, 3 : stem tip culture, 4 : cutting of callus, 5 : shoot primordia and adventitious shoots, 6 : cutting of shoot primordia including adventitious shoots, 7 : regeneration of plants, 7→6 : subculture (transfer of shoot primordia), 8 : rooting, 9 : transplanting, 10 : further growth of plants.

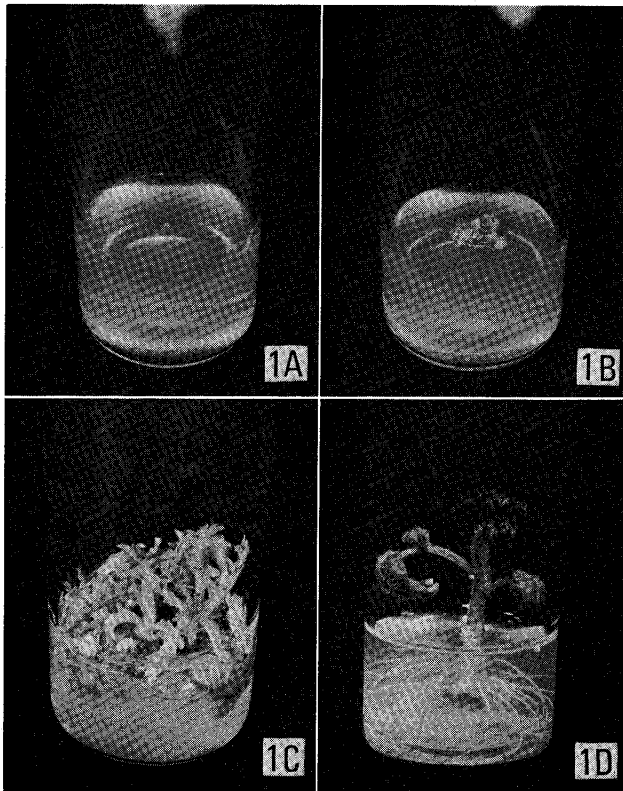


Photo. 1. The process of shoot differentiation by stem tip culture of a nuclear male sterile line of tomato.

1A : 14 days after stem tip culture, 1B : shoot primordia formation, 1C : shoot regeneration, 1D : rooting from a shoot.

うなフローチャートができる。Photo. 1 はその過程における様相を示したものである。すなわち、茎頂を摘出後、まず、ゼアチン 1 mg/l を含む LS 寒天培地に培養して原塊体様のカルスを形成させてから、それらを分割して同一培地へ移植して苗条原基を作出させる。その後、原基を分割してゼアチン 0.2 mg/l を含む LS 寒天培地へ継代培養して、苗条を再分化し発根させるとともに、同時に形成された苗条原基を継続的に分割利用することによって、再分化苗条個体の本数を高めることができる。この手法によるとして、継代培養と分割利用による、雄性不稔系統の増殖本数を試算した結果、トマト 1 個の茎頂培養で年間に約 3,500 本の苗を生産できる見通しを得た（関係表略）。

再生個体 192 本の形態調査結果では、その中の 1 本が花に、ほかの 1 本が葉にそれぞれ奇形の様相を示した

が、いずれの個体も稔性回復の徴候はまったく認められなかった。したがって、雄性不稔の特性が茎頂培養を経由しても遺伝的に安定していることが確認された。

(2) ビーマンの細胞質雄性不稔系統の増殖

1) 植物生長ホルモンと植物体再分化との関係

まず、発芽後 0～9 日目の子葉を 1～2 mm の幅に切断して、苗条原基の増殖（ゼアチン 5 mg/l, IAA 0.25 mg/l 添加 LS 寒天培地利用）と原基からの苗条再分化（ゼアチン 1 mg/l 添加 LS 寒天培地利用）に関して検討したところ、子葉の葉齢は発芽直後、その切断幅は 1 mm のよいことがわかった（関係表略）。

そこで、発芽直後の子葉を 1 mm 幅に切断して、これらを IAA とサイトカイニンを組み合わせた LS 寒天培地に置床し、苗条の再分化率を調査した。その結果によると、ゼアチン 5 mg/l, IAA 無添加の培地が最もよ

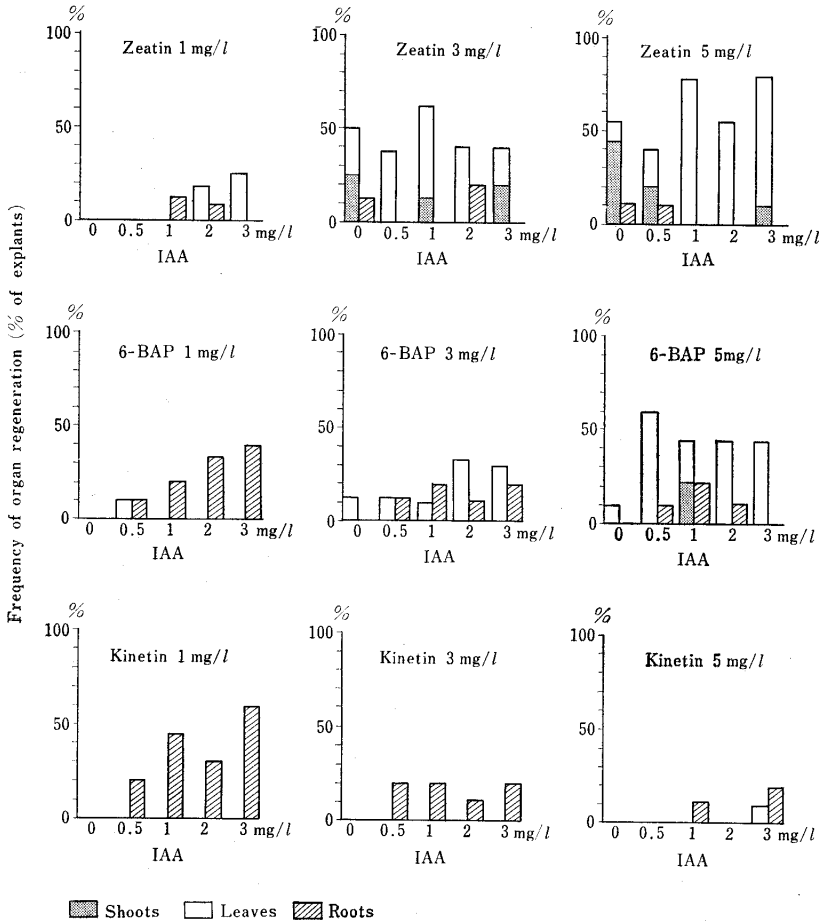


Fig. 3. Effects of phytohormones on the organ differentiation from cotyledonary explants of a cytoplasmic male sterile line of sweet pepper. Ten explants were tested for each hormone combination.

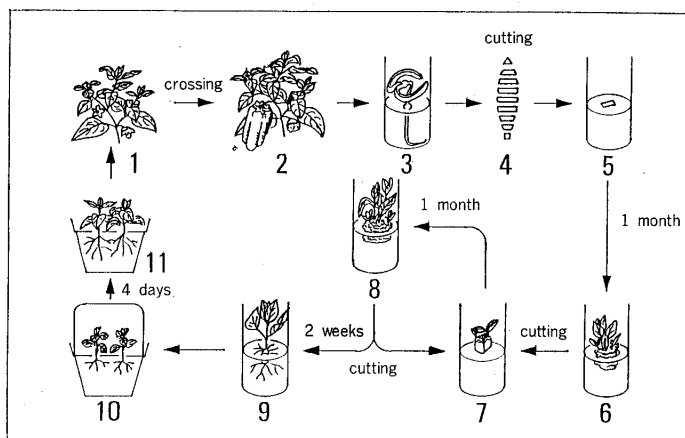


Fig. 4. Mass propagation system of a cytoplasmic male sterile line of sweet pepper. 1 : mother plant, 2 : crossing of fertility plant and fructification, 3 : aseptic germination, 4 : cutting of cotyledon, 5 : explant culture, 6 : shoot primordia and adventitious shoots, 7 : cutting of shoot primordia including adventitious shoots, 8 : regeneration plants, 8→7 : subculture (transfer of shoot primordia), 9 : rooting, 10 : transplanting, 11 : further growth of plants.

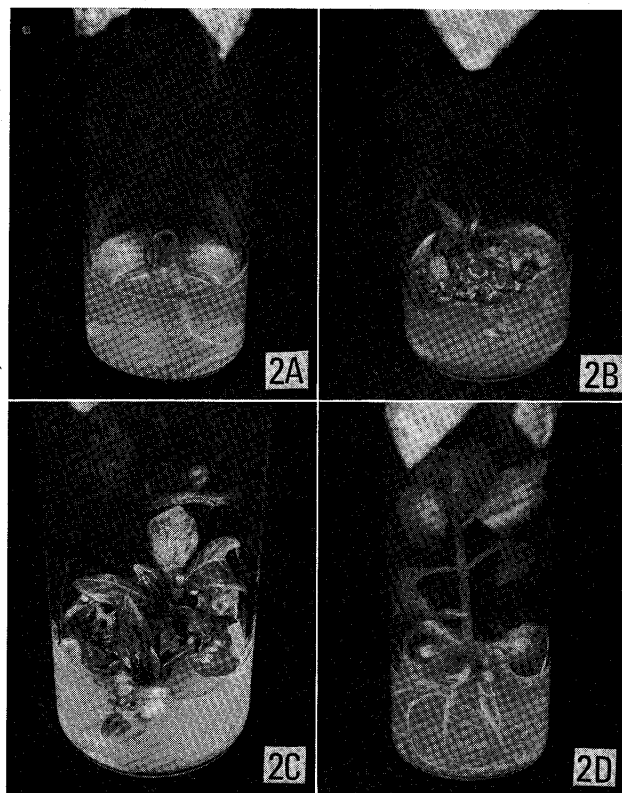


Photo. 2. The process of shoot differentiation by explant culture of a cytoplasmic male sterile line of sweet pepper. 2A : aseptic germination, 2B : shoot primordia formation, 2C : shoot regeneration, 2D : rooting from a shoot.

かった (Fig. 3).

2) 大量増殖法の確立と遺伝的変異

前述の結果を踏まえて、子葉の葉片利用による再生個体の大量増殖法を検討した。Fig. 4 はその完成した大量増殖の操作概略を示したフローチャートであり、Photo. 2 はその過程における様相を示したものである。

すなわち、1 mm 幅に細刻した子葉の外植片をゼアチン 5 mg/l を含む LS 寒天培地で培養して苗条原基を形成させる。その後はトマトの場合と同様な手法でもって再分化個体数を増加させることができる。ただこの際、継代培養には、培地のゼアチン濃度を 1 mg/l に下げることがよい結果が得られる。この手法によるとして、増殖本数を試算してみると、発芽直後の 2 枚の子葉を利用して、カルス経由で年間約 1 千本の苗の生産が可能である (関係表略)。

再生個体約 400 本の形態調査結果では、その中の 2 本にふ入り葉の出現を観察した程度であって、トマトの場合と同様に、稔性回復の徴候がまったく認められなかった。したがって子葉由来のカルス経由でも、細胞質雄性不稔の特性が遺伝的に安定していることを確認できた。

4. 考 察

(1) トマトの核遺伝子雄性不稔系統の増殖

前述のように、著者らは葉片および茎頂培養による苗条の再分化・増殖に、培地に添加するサイトカイニン中ゼアチンがきわめて効果の高いことを明らかにした。

Kartha ら²⁾はトマトの栽培種の葉片を用いて、サイトカイニンとオーキシンの種類と種々の濃度を組み合わせた培養実験で、苗条と根の分化にゼアチンおよび BA と IAA の組み合わせが効果高く、カイネチンと IAA の組み合わせでは苗条が発生しなかったことを報告し、その報告の中でゼアチン約 1 mg/l の単一利用で植物体を再生させている。また、Meredith³⁾もトマトの栽培種を用いて、葉片由来のカルスからゼアチンと IAA の組み合わせから苗条を発生させ、そのゼアチン濃度効果は 5 mg/l よりも 2 mg/l の方が高いことを報告し、ゼアチン濃度は低い方がよいことを示唆した。著者らの核遺伝子雄性不稔系統を用いた実験結果においても、これら既往の業績とも一致するわけで、培地に添加するゼアチン濃度は 1 mg/l が最適であろう。

すでにトマトでは、無菌苗の胚軸または苗条の生長点から増殖可能と思われる植物が発育し得ることを明らかにした業績⁴⁾が発表されているが、腋芽の茎頂を用いて苗条の増殖に成功した著者らの実験例は、著者らの知る限りでは世界的にも初めてである。しかもその増殖法を

確立し、さらに再生した個体群が雄性不稔形質において安定していることを明らかにした点は注目値する。

(2) ピーマンの細胞質雄性不稔系統の増殖

前述のように、ピーマンの子葉の外植片を用いて、サイトカイニンと IAA の組み合わせの中で、苗条の再分化にはゼアチン 5 mg/l 添加培地が最適であることを明らかにした。そしてこの結果を踏まえて苗の大量増殖法を開発した。従来からカルス由来の再生植物には、突然変異の出現が懸念されているが、本研究結果ではこうした現象がわずかに認められたに過ぎない。

Gunay ら⁵⁾はトウガラシ属の 3 品種を用いて、子葉からの植物体の再生には、Murashige and Skoog (MS) 培地に IAA 1 mg/l と BA 2 mg/l を添加した場合に最良であったと述べた。しかし、この実験設計はゼアチンとオーキシンの組み合わせについて十分な配慮がなされなかった。もしゼアチンと IAA との関係について詳しく検討されていたならば、著者らの結果とあるいは一致したかも知れない。ともかく、子葉利用によるピーマンの細胞質雄性不稔系統における植物体の再分化およびその増殖には、ゼアチン 5 mg/l 添加の MS または LS 寒天培地が有望であろう。

5. 結 語

先端技術として注目されるバイオテクノロジーの中でも、組織培養法を駆使した苗木の大量増殖法は実用化技術として、すでに多数の作物・野菜・花卉・果樹類などにおいてそれぞれの手法が確立されている。ところが、雄性不稔系統の維持・増殖法に着目した例は、著者らの知る限りではない。本研究はこうした分野での組織培養技術の開発を目的として、野菜の中でも世界的に需要の高いトマトとピーマンに着目して、前述のと通りの成果を得たわけである。いずれの野菜の再生個体とも稔性回復の突然変異 (可稔遺伝子) を発現しないことから、組織培養法を背景としたこの研究で確立した大量増殖法は、やがて実用化技術として利用される基盤になるであろう。

本研究は科学技術庁の科学振興調整費による「熱帯・亜熱帯の植物資源の医薬・農薬・食糧としての開発利用に関する委託研究」の一部であり、昭和56年度から昭和58年度までの3カ年間、農林水産省野菜試験場からの委託を受けて行ったものである。供試材料の提供、そのほか研究遂行上、有益な助言をいただいた農林水産省野菜試験場育種第1研究室長 高柳謙治 博士に対し、厚く感謝の意を表する。

文 献

- 1) Tanaka, R., H. Ikeda, 1983. Jpn. J. Genet., 58 : 65-70.
- 2) Kartha, K.K., O.L. Gamborg, J.P. Shyluk, 1976. Z. Pflanzenphysiol., 77 : 292-301.
- 3) Meredith, C.P., 1979. Z. Pflanzenphysiol., 95 : 405-411.
- 4) Tibor, F., 1979. Kertgazdasag, 11 : 59-64.
- 5) Gunay, A.L., P.S. Rao, 1978. Plant Sci. Lett., 11 : 365-372.

Summary
Mass Propagation of Male Sterile *Solanaceae* Vegetables through Tissue Culture

Teruyoshi NAGAO and Hiroshi BETSUI

Japan Tobacco Incorporation Central Research Institute
 6-2, Umegaoka, Midoriku, Yokohama 227

Leaf and stem tip explants of male sterile lines of tomato and sweet pepper were cultured in vitro on Linsmaier and Skoog medium under controlled environmental conditions. In leaf explants of both vegetables, combinations of IAA and zeatin were more effective for inducing shoot differentiation than those of IAA and 6-benzylaminopurin or kinetin. Multiple shoot differentiation from the calli occurred when zeatin alone was used at 1 mg/l for tomato explants, and at 5 mg/l for sweet pepper explants.

Mass propagation system by using stem tips of male sterile tomato and cotyledonary cuttings of male sterile sweet pepper were developed. A large number of plants were regenerated and grown to maturity according to the methods developed in this study. All the regenerated plants were male sterile as were mother plants and no gross morphological changes except for a few variegated leaves or malformed flowers and leaves were observed among the regenerated plants.