

キク(Dendranthema × grndiflorum(Ramat.)Kitamura)プロトプラストからの植物体の効率的な再分化

誌名	福井県農業試験場研究報告
ISSN	13412345
著者名	古田,秀雄 野村,幸雄 前田,榊夫 真柄,紘一
発行元	福井県農業試験場
巻/号	33号
掲載ページ	p. 7-13
発行年月	1996年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



キク(*Dendranthema × grndiflorum* (Ramat.) Kitamura)

プロトプラストからの植物体の効率的な再分化

High efficient plant regeneration from protoplasts

of *Chrysanthemum*(*Dendranthema × grndiflorum*

(Ramat.) Kitamura)

古田秀雄*・野村幸雄**・前田榊夫***・真柄 紘一****

Hideo FURUTA, Yukio NOMURA, Masuo MAEDA and

Koichi MAKARA

プロトプラストから植物体を再分化させる技術は、細胞融合や遺伝子組換えを用いた植物の改良に不可欠である。キク(*Dendranthema × grndiflorum* (Ramat.) Kitamura) 品種‘秀芳の力’のプロトプラストの再分化技術を確立したので報告する。

無菌植物体本葉から単離したプロトプラストを、ジェランガムで包埋し、硝酸アンモニウムを100 mg/lに減じた修正1/2 MS培地(2mg/l NAA, 1 mg/l BAP)を用いて培養、コロニーを形成させた。プロトプラスト由来コロニーの生育は、緩慢で、カルス形成まで2ヵ月を要した。このカルスを再分化培地(MS培地, 0.5 mg/l BAP, 0.2 mg/l GA₃)に移植したところ、効率よく植物体を再生した。再分化した植物はガラスハウス内で順化し、生育は良好であった。

Key Words: キク, プロトプラスト, 再分化

I 緒 言

キクは、我が国では最も重要な花き園芸作物の一つであり、福井県でも生産量、生産額ともに1位を占める花き品目である。キクの切り花としての生産が増えるにつれて、花色など新しい形質を持つキクの育成が望まれている。しかし、キクの育種は交配や、枝変わりなど従来の育種方法で行われており導入できる形質は限られている。新しい品種を育成するためには、バイオテクノロジーを利用した新しい育種法の開発が必要である。

バイオテクノロジーを利用した新しい植物の作出には、プロトプラストが利用されていて、ポマト¹⁾や、ハクラン²⁾など細胞融合植物や、イネの遺伝子組み換え植物³⁾はプロトプラストから作出されている。そのためプロトプラストの培養法は、バイオテクノロジーを利用するための最も重要な技術の一つである。プロトプラストの培養方法はキクでも数例の報告^{2,4)}があるが、安定した技術として確立しているのはタバコやイネなど数

種類に限られている。今回、より効率的にキクプロトプラストから植物体を再生する技術を確立した。

II 材料および方法

1. 植物材料

試験材料として、‘秀芳の力’、‘スノークイン’、‘スワン’、‘シャトル’、‘レフォール’、‘マーガレットマム’の6品種を用いた。

これら品種の茎頂を、植物ホルモンを含まないMS培地上で培養することで無菌植物を作出し、プロトプラスト単離のための材料とした。

2. プロトプラストの単離

無菌植物の幅1~2 cmの葉の裏面に、メスで1 mm角の格子状の傷をつけ、傷をつけた面を下にして酵素液(1% セルラーゼ R-10, 0.5% マセロザイム R-10, CPW塩⁵⁾, 0.4M マンニトール, pH 5.6)に浸し、25℃で、16時間静置しプロトプラストを単離した。

その後、酵素液をナイロンフィルター(50 μmメッシュ)に通し、未消化物を取り除いた後、70gで3分遠心分離し、プロトプラストのみを沈殿させた。沈殿したプロトプラストを洗液(0.4M マンニトール, 2mM 塩化カルシウム)で三回洗浄し、プロトプラスト密度を測定し、洗液で密度を調整した。

* 福井県農業試験場 育種研究チーム

** 福井県農業試験場 バイテク研究チーム

*** 福井大学 教育学部

**** 坂井農業改良普及センター

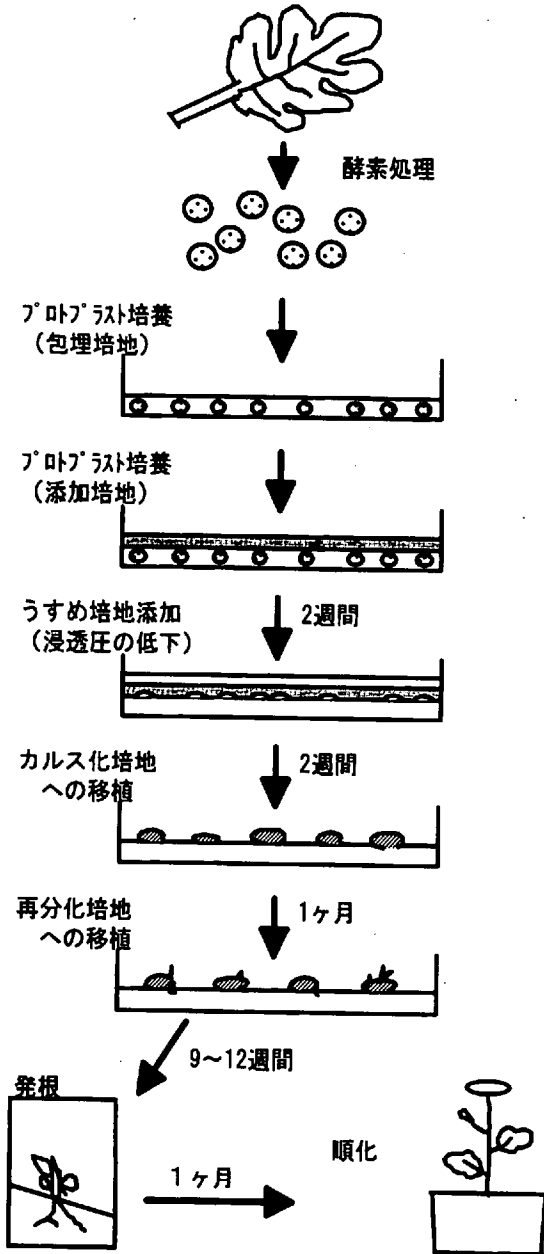
3. プロトプラストの培養

プロトプラストの培養方法は、1) の手順を基準とし、各項目ごとに検討を加えた。

1) プロトプラスト培養方法

プロトプラスト培養、再分化培地組成を第1表に、プロトプラストの培養手順を第1図に示した。

直径60mmのプラスチックシャーレ上で、洗液で密度を調整したプロトプラスト懸濁液 0.5ml に、電子レンジで溶解した包埋培地を等量加え、固化した後、添加培



第1図 キクのプロトプラスト培養手順

地を1ml加えた。プロトプラストは、25℃、暗所で14日間培養した後、培地中の浸透圧を下げ、細胞分裂を促進するため、うすめ培地 2 ml を加えた。その後14日目に、生育してきたコロニーをカルス化培地上に置床し、25℃で、2000lx、16時間日長下で1ヵ月培養した。生育したカルスを再分化培地に移し、3週間ごとに同一培地で継代することで植物の再分化を促した。再分化したシュートは、発根培地上で発根させた後、ガラスハウス内で順化した。

2) プロトプラスト包埋培地と添加培地の検討

包埋培地のゲル化剤として、0.4% ジェランガムまたは1.6% 寒天を用い、キク 'スノークイン' のプロトプラストを 10.0×10^4 個/ml の培養密度で包埋した。そして、それぞれを硝酸アンモニウムの濃度を0, 100, 200, 400, 800mg/l に調整した添加培地を加え培養した。プロトプラストの分裂は培養7日目に、また、コロニー形成は培養4週間目に、カルス化は培養6週間目に観察した。

3) キクのプロトプラストの培養密度の検討

キク 'スノークイン' のプロトプラストを、 $1.3 \times 10^4, 2.5 \times 10^4, 5.0 \times 10^4, 10.0 \times 10^4$ 個/ml の培養密度でジェランガムに包埋し、硝酸アンモニウムを含まない添加培地を加え培養した。培養2週間目にプロトプラストの分裂、4週間目にコロニー形成を観察した。

第1表 キク '秀芳のか' プロトプラスト培養、再分化の培地組成

培地組成	包埋培地	添加培地	うすめ培地	カルス化培地	再分化培地	発根培地
無機成分 (mg/l)						
KNO ₃	950	950	950	950	1900	1900
NH ₄ NO ₃	-	100	100	825	1650	1650
MgSO ₄ -7H ₂ O	185	185	185	185	370	370
CaCl ₂ -2H ₂ O	220	220	220	220	440	440
K ₂ HPO ₄	85	85	85	85	170	170
MnSO ₄ -4H ₂ O	11.15	11.15	11.15	11.15	22.3	22.3
ZnSO ₄ -7H ₂ O	4.3	4.3	4.3	4.3	8.6	8.6
CuSO ₄ -5H ₂ O	0.0125	0.0125	0.0125	0.0125	0.025	0.025
CoCl ₂ -6H ₂ O	0.0125	0.0125	0.0125	0.0125	0.025	0.025
KI	0.415	0.415	0.415	0.415	0.83	0.83
H ₂ BO ₃	3.1	3.1	3.1	3.1	6.2	6.2
Na ₂ MoO ₄ -2H ₂ O	0.125	0.125	0.125	0.125	0.25	0.25
Na ₂ EDTA	18.65	18.65	18.65	18.65	37.3	37.3
FeSO ₄ -7H ₂ O	13.9	13.9	13.9	13.9	27.8	27.8
ビタミン類 (mg/l)						
Inositol	50	50	50	50	100	100
Glycine	1	1	1	1	2	2
Nicotinic acid	0.25	0.25	0.25	0.25	0.5	0.5
Pyridoxine-HCl	0.25	0.25	0.25	0.25	0.5	0.5
Thiamine-HCl	0.05	0.05	0.05	0.05	0.1	0.1
糖 (g/l)						
Sucrose	10	10	30	30	40	30
Mannitol	72.87	72.87	-	-	-	-
植物ホルモン (mg/l)						
NAA	-	2	0.5	0.5	-	-
BA	-	1	0.5	0.5	-	-
GAs	-	-	-	-	0.2	-
IBA	-	-	-	-	-	0.02
その他						
Cellan Gum (g/l)	4	-	-	2	3	2
pH	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8

4) キクのプロトプラスト培養条件の品種間差の検討

キク6品種‘秀芳の力’、‘スノークイン’、‘スワン’、‘シャトル’、‘レフォール’、‘マーガレットママ’のプロトプラストを 10.0×10^4 個/mlの培養密度でゼランガムに包埋し、それぞれの品種に硝酸アンモニウムの濃度を0,100,200,400,800 mg/lに調整した添加培地を加え培養した。培養2週間目にプロトプラストの分裂、4週間目にコロニー形成、6週間目にカルス化を観察した。

5) 再分化培地の植物ホルモン組成の検討

植物ホルモンとして、ベンジルアミノプリン (BAP) (0.2,0.5,2.0 mg/l), インドール酢酸 (IAA) (0.0, 0.5 mg/l), ナフトレン酢酸 (NAA) (0.0,0.1,0.5 mg/l), ジベレリン (GA_3) (0.0,0.2 mg/l) を組み合わせ、再分化培地を作製した。キク‘秀芳の力’プロトプラスト由来カルスを、それぞれの再分化培地上で3週間ごとに継代した。キクの再分化は12週間後(3回継代)に観察した。 GA_3 は水溶液を濾過滅菌し、オートクレーブ後の培地に加えた。

III 結 果

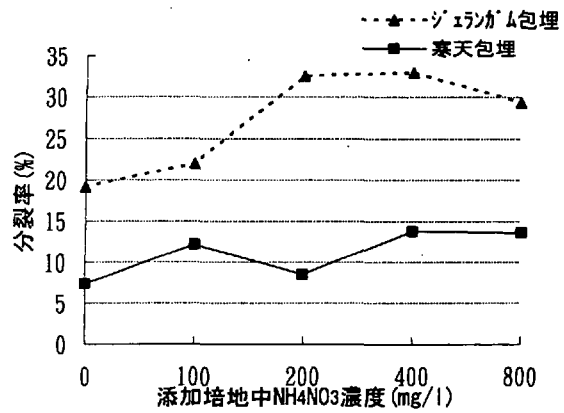
1. プロトプラスト包埋培地と添加培地の検討

‘スノークイン’のプロトプラストは、ゲル化剤として、0.4%ゼランガム、または、1.6%寒天を用いた包埋培地の中で、安定して分裂した。分裂の状態をゲル化剤の種類で比較すると、ゼランガムを用いた方の分裂率が高く、硝酸アンモニウム濃度400mg/lでは32.6%の分裂が観察された。寒天の場合は、最高でも硝酸アンモニウム濃度400mg/lでの13.8%しか分裂しなかった(第2図)。

また、包埋したプロトプラストの生育を継続して観察すると、寒天で包埋したプロトプラストの多くは、分裂しても培養中に褐変し、カルスまで生育するものは、ほとんどなかった。しかし、ゼランガムを用いた場合は、分裂後の生育が良く、添加培地中の硝酸アンモニウム濃度が200 mg/l以下で活発に細胞分裂し、カルスの形成が見られた。特に、硝酸アンモニウムを含まない培地中での生育が良好であった(第2表)。

2. キクのプロトプラストの培養密度の検討

プロトプラストを 1.3×10^4 個/mlや 2.5×10^4 個/mlの培養密度で培養すると、2週間後には30%以上のプロトプラストが分裂していた。しかし、その後の分裂を停止する細胞が多く、4週間後のコロニーの形成は 1.3×10^4 個/mlでは観察できず、 2.5×10^4 個/mlの場合、わずかに8.0%のプロトプラストがコロニー形成した。

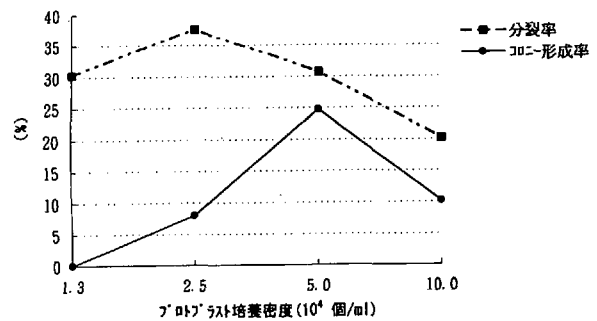


第2図 キク‘スノークイン’のプロトプラストの分裂に対するゲル化剤とNH₄NO₃の影響

第2表 ゲル化剤および添加培地中の硝酸アンモニウム濃度がキクのプロトプラストのカルス化に及ぼす影響

ゲル化剤	添加培地中NH ₄ NO ₃ 濃度 (mg/l)	コロニー形成	カルス化
寒天	0	+	±
	100	+	-
	200	±	-
	400	±	-
	800	-	-
ゼランガム	0	++	++
	100	+	±
	200	+	±
	400	+	-
	800	+	-

++:多 +:中 ±:少 -:無
 コロニー形成:培養4週間目
 カルス化:培養6週間目に調査した。



第3図 プロトプラストの分裂とコロニー形成に対する培養密度の影響

しかし、 5.0×10^4 個/mlの場合は2週間後の分裂率、そしてその後の生育も良好で、最も多くのコロニーが観察できた。 10.0×10^4 個/mlの培養密度では、褐変するプロトプラストが多かったが分裂後の生育は良好で、コロニー形成率は2番目に高かった(第3図)。

3. キクのプロトプラスト培養条件の品種間差

キク6品種（‘秀芳の力’，‘スノーケイン’，‘スワン’，‘シャトル’，‘レフォール’，‘マーガレットママ’）のプロトプラストを培養した。‘マーガレットママ’のプロトプラストは全く分裂しなかったが，他の5品種のプロトプラストは分裂を行った。これら5品種の培養2週間目を観察したところ，‘秀芳の力’，‘スノーケイン’，‘レフォール’では添加培地中の硝酸アンモニウム濃度が高い場合に分裂率が高かった。しかし，硝酸アンモニウム濃度が高いと分裂後の細胞が褐変し，コロニー形成，およびカルス化へ至らないものが多かった（第3表）。

以上のことから，‘秀芳の力’のコロニー形成，カルス化には添加培地中の硝酸アンモニウム濃度を100 mg/lにするのがよく，‘スノーケイン’，‘スワン’，‘シャトル’，‘レフォール’では無添加が適すると判断された。

4. 再分化培地の植物ホルモン組成

カルスはIAA，NAAといったオーキシンを加えた培地上では全く再分化しなかったが，0.2 mg/l，0.5mg/l BAPを単独に加えたそれぞれの培地上では，1.6～3.1%のカルスからの再分化が観察された。また，培地に0.5 mg/l BAPと0.2 mg/l GA₃を加えた場合は，20.3%が再分化し，最大となった（第4表）。

再分化した植物を発根培地上で発根生育させた後，ガラスハウス内で順化したところ，順調な生育を示した。

第3表 プロトプラスト培養におけるキクの品種間差

品種	添加培地中 NH ₄ NO ₃ 濃度 (mg/l)	分裂	コロニー形成	カルス化
秀芳の力	0	+	+	+
	100	+	++	++
	200	++	++	±
	400	++	+	-
	800	++	+	-
スノーケイン	0	+	++	++
	100	+	+	+
	200	++	+	±
	400	++	+	-
	800	++	+	-
スワン	0	+	±	±
	100	+	+	-
	200	+	+	-
	400	+	+	-
	800	+	+	-
シャトル	0	+	+	+
	100	+	±	-
	200	+	-	-
	400	+	-	-
	800	+	-	-
レフォール	0	+	±	±
	100	+	-	-
	200	++	-	-
	400	++	-	-
	800	++	-	-
マーガレットママ	0	-	-	-
	100	-	-	-
	200	-	-	-
	400	-	-	-
	800	-	-	-

++：多 +：中 ±：少 -：無
 分裂：培養2週間目
 カルス化：培養6週間目に調査した。

第4表 キクプロトプラスト由来カルスの再分化における植物ホルモンの影響

品種	植物ホルモン(mg/l)				置床加数	再分化 カルス数	再分化率 (%)
	BAP	IAA	NAA	GA ₃			
秀芳の力	0.2	0	0	0	64	2	3.1
	0.5	0	0	0	64	1	1.6
	0.2	0.1	0	0	64	0	0
	2	0.5	0	0	64	0	0
	0.2	0	0.1	0	64	0	0
	2	0	0.5	0	64	0	0
	0.2	0	0	0.2	64	1	1.6
	0.5	0	0	0.2	64	13	20.3
	0.2	0.1	0	0.2	64	0	0
	2	0.5	0	0.2	64	0	0
	0.2	0	0.1	0.2	64	0	0
	2	0	0.5	0.2	64	0	0

IV 考 察

1. プロトプラストの単離および包埋培地と添加培地

キクは試験管内での生育が速く、プロトプラスト単離材料である葉を安定して得ることができた。また酵素処理を静置条件で行うことで活性の高いプロトプラストが得られた。

しかし、キクプロトプラストは単離操作中や培養中に凝集することがあり、凝集した細胞は分裂しなかった。凝集は細胞膜の損傷が原因と考えられるため、キクプロトプラストの培養操作は穏やかに行う必要がある。また、培養中の凝集を防ぐためプロトプラストをゲルで包埋し、培養する必要があると思われる。

寒天を用いた場合、プロトプラストの分裂率が低く、その後の生育も悪かった。培養用寒天には様々な不純物が含まれており、キクのプロトプラストの生育を阻害する物質も含まれていた可能性も考えられる。ゼランガムのように精製した試薬をプロトプラスト包埋用のゲル化剤として用いる必要があると考えられた。

しかし、ゼランガムは融点が高いため、包埋時にキクプロトプラストに高温による傷害を与え、活性を低下させる可能性がある。また、操作中に試薬が固まりやすいなど作業上の問題もあった。しかし、より融点の低い寒天と比較しても、ゼランガムがプロトプラストの活性を低下させることはなく、高温による傷害はあまりないと考えられた。また、器具を暖めるなど作業手順を工夫することで、作業上の問題も解決した。

添加培地中の硝酸アンモニウムを減じることで、培養中のプロトプラストの褐変を抑制し、カルス形成させることができた。しかし、硝酸アンモニウム濃度を低下させると、培養初期（培養7日目）のプロトプラスト分裂率も低下した。これは、培地中の窒素成分の低下が原因と考えられる。制限した窒素成分を、アミノ酸で補う方法も報告されており、キクでもアミノ酸など有機窒素成分を加えることで、さらに安定した培養方法を確立できると考えられる。

2. プロトプラストの培養密度

キクプロトプラストを培養する場合 5.0×10^4 個/mlが適していた。これより低い密度では分裂後の生育が悪く、高い密度では、褐変する細胞が多くなった。‘スノークイン’以外の品種でも同様の傾向が観察された。プロトプラストを培養する際、培養密度が低すぎると分裂、生育しにくい。これは、生きた細胞の生産する物質により細胞分裂が促進されるからだと考えられる。また、密度が高すぎても培地の成分が不足することにより生育が悪くなるが、本試験においてもこれらの

ことが制限因子となって適正な密度が決定されたものと考えられた。

3. プロトプラスト培養条件の品種間差

1) プロトプラストのカルス化

今回、キク6品種の培養を行ったが、品種により明らかな差が見られ、プロトプラスト培養は、組織培養と比較して、かなりの品種間差が存在すると考えられた。‘マーガレットマム’はプロトプラストの分裂も見られなかった。他の5品種は分裂したが、‘秀芳の力’と他のスプレーギク品種とでは最適培地が異なり、品種ごとに、最適の培養条件を設定する必要があることが示唆された。

‘マーガレットマム’は、プロトプラスト単離材料である無菌植物の成葉が小さく、他の品種とは異なっていたことから、‘マーガレットマム’プロトプラストを培養するにはプロトプラスト単離材料の検討が必要と考えられた。

2) プロトプラスト由来カルスの再分化

今回、様々なサイトカイニンとオーキシンを組み合わせさせた培地上での再分化を試みた。その中で0.2 mg/l BAPを含む培地上で、‘秀芳の力’のカルスから低率ではあるが再分化した。しかし、再分化した植物は水浸状で、正常な植物体は得られなかった。再分化培地中にジベレリンを加えることで正常な植物体を得られ、0.5 mg/l BAPと0.2 mg/l GA₃を加えた再分化培地では安定的かつ効率的に植物体が再分化した。ジベレリンはシュートの伸長を促す効果があり、未熟なシュートの伸長に効果を示したのと考えられた。

また、‘スノークイン’、‘スワン’、‘シャトル’、‘レフォル’のプロトプラスト由来のカルスでも同様に再分化培地の検討を行ったが、カルスからの再分化は観察されなかった。これら4品種はスプレーギクであり、‘秀芳の力’とは異なる培養方法を用いなければ再分化植物を得られないと思われた。スプレーギク品種の再分化のためには、培養細胞からプロトプラストを単離するなど、再分化能力の高いプロトプラストを単離する必要があると考えられた。

4. まとめ

今回、キク‘秀芳の力’のプロトプラストから植物体を再分化する技術を確立した。この技術は、細胞融合や、遺伝子組換えなどの植物のバイオテクノロジーを利用した育種の基礎となるものである。今後、この技術を利用して、細胞融合条件などキクの品種育成のための試験を行う予定である。

V 引用文献

- 1) 大源正明・川上修(1994). コシヒカリの効率的な懸濁培養条件. 北陸作物学会報 (別冊) 30:60-61.
- 2) 深井誠一・柴田道夫・天野正之・山崎教道・大江正温 (1988/1989). キクプロトプラストからの植物体再生. 大阪農技セ研報 25:25-30.
- 3) Frearson, E. M., Power, J. B. and Cocking, E. C. (1973). The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. *Dev Biol.* 33:130-137.
- 4) Kyozyuka, J., Hayasi, Y. and Shimamoto, K. (1987). High frequency plant regeneration from rice protoplasts by novel nurse culture methods. *Mol. Gen. Genet.* 206:408-413.
- 5) Melcher, G. and Labib, G. (1978). Somatic hybrid plants of potato tomato regenerated from fused protoplasts. *Carlsberg res. Commun.*, 43:203-213.
- 6) 大塚寿夫・末松信彦・戸田幹彦(1985). キクプロトプラスト培養と植物体再分化. 静岡農試研報 30:25-33.
- 7) Shimamoto, K., Terada, R., Izawa, T. and Fujimura, H. (1989). Fertile transgenic rice plant regeneration from transformed protoplasts. *Nature* 338:274-276.
- 8) Taguchi, T. and Kameyama, T. (1986). Somatic hybrid plants between cabbage and Chinese cabbage through protoplast fusion. *Japan J. Breed.* 36:185-189.

High efficient plant regeneration from protoplasts of *Chrysanthemum*(*Dendranthema* × *grndiflorum* (Ramat.) Kitamura)

Hideo FURUTA, Yukio NOMURA, Masuo MAEDA, Koichi MAKARA

Summary

Plant regeneration from protoplasts is prerequisite to produce modified plants using somatic hybridization and transformation. A protocol for regenerating plants from mesophyll protoplasts of *Chrysanthemum* (*Dendranthema* × *grndiflorum* (Ramat.) Kitamura, cv. 'Syuhou-no-chikara') has been developed.

Protoplasts isolated from the leaves of *in vitro* plants formed colonies when cultured in Gellan Gum beads in a modified 1/2 MS medium containing 2 mg/l NAA and 1 mg/l BAP. This modification of the medium was reduction of nitrate ammonium to 100 mg/l. Protoplast-derived colonies grew slowly into calli in two months. Shoot regeneration was found on the calli of 'Syuhou-no-chikara' on a MS medium containing 0.5 mg/l BAP and 0.2 mg/l GA₃. Regenerated plants were successfully grown up in a greenhouse after acclimation.