

アサガオ未熟胚からの個体再生および試験管内開花法の確立

誌名	植物環境工学
ISSN	18802028
著者名	真野,佳博 湯澤,宏恵 渡辺,勝
発行元	日本植物工場学会
巻/号	17巻4号
掲載ページ	p. 217-220
発行年月	2005年12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



アサガオ未熟胚からの個体再生および試験管内開花法の確立

真野佳博・小島久美子・小島章江

東海大学開発工学部生物工学科 410-0321 沼津市西野 317

Regeneration of *Pharbitis nil* from Immature Zygotic Embryos and Photoperiodic Induction of Flowering *in vitro*

Yoshihiro MANO, Kumiko KOJIMA and Akie KOJIMA

Department of Biological Science and Technology, Tokai University,
317 Nishino, Numazu, Shizuoka 410-0321, Japan

Abstract

Regeneration procedures for *Pharbitis nil* Choisy cv. Violet, a recalcitrant species for plant regeneration *in vitro*, were established using immature zygotic embryos as starting materials. Embryogenic calli were formed in LS (5% sucrose) medium containing 1×10^{-5} M of 4-fluorophenoxyacetic acid (Emc medium) under light conditions, and transferred to LS (5% sucrose) medium containing 1.5×10^{-5} M of abscisic acid and 3×10^{-6} M of gibberellic acid (Eb medium) to form adventitious embryos. Plantlets were regenerated in LS (3% sucrose) medium (Pt medium) after 8 to 9 weeks of culture. The regenerated plants were induced to flower by a single short-day treatment *in vitro*.

Keywords : embryogenesis, flowering *in vitro*, immature fruits, *Pharbitis nil* Choisy cv. Violet, regeneration.

1. 緒 言

アサガオ (品種; ムラサキ) [*Pharbitis nil* Choisy cv. Violet (アサガオムラサキと略記する)] は短日性植物であり、子葉展開時に1度だけ16時間程度の暗期を与えるだけで花成を誘導できるという特性を有している (Imamura, 1967)。従って、このアサガオムラサキを用いて、花成誘導機構解明のための多くの研究がなされてきた (Sage-Ono *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003a; Kim *et al.*, 2003b; Oguchi *et al.*, 2004; Parfitt *et al.*, 2004)。

花成を人為的に制御できれば、園芸分野では花卉の生

産に有利である。また、花成の制御によって、それに続く結実、収穫時期の人為的制御も可能となる。このように、花成誘導機構を解明し、花成を制御することは農業上極めて重要である。近年、 α -ケトールリノレン酸に花成誘導作用のあることが見いだされ、アサガオでその作用が確認されているが (Suzuki *et al.*, 2003)、花成ホルモンの実体はまだ明らかになってはいない。

一方、花成誘導に関わる遺伝子の単離が試みられており、アサガオにおいても花成誘導に関わると考えられる遺伝子の解析が進められている (Liu *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003a; Parfitt *et al.*, 2004)。そこで、単離した遺伝子の機能解析をするために、遺伝子導入した細胞組織からの個体再生が必要不可欠となるが、アサガオは個体再生が極めて難しい。これまでに、根や子葉などからの個体再生が試みられているが、完全な植物体には至っていない (Trejgell *et al.*, 1998)。ただし、アサガオ未熟胚から子葉を切除した胚軸を培養し、幼植物体を得たという報告はある (Yoneda, 1990)。また、未熟胚からの

2005年8月1日受付

2005年9月22日受理

Corresponding author: Yoshihiro Mano

(y-mano@wing.ncc.u-tokai.ac.jp)

個体再生法が示されているが、複雑で長期間の培養過程を経なければならぬ (Jia and Chua, 1992; Ono *et al.*, 2000).

そこで本研究では、アサガオ未熟胚からの簡単に効率の良い個体再生法を確立することを目的とした。また、個体再生した植物体を培養容器内で開花させることは、多くの植物で極めて困難である。この *in vitro* での開花法が確立されると、遺伝子組換え植物を用いた実験において、開花までの過程を閉鎖環境下で検討できる、また、広い栽培面積を必要としない等、多くの利点がある。そこで本研究では、培養容器内で開花させる方法についても検討した。

2. 材料および方法

2.1 植物および細胞組織

アサガオ (品種; ムラサキ) [*Pharbitis nil* Choisy cv. Violet] の種子 [丸種株式会社 (京都)] から発芽させた植物体を室内で栽培し、開花後 15 日前後の未熟果実から未熟胚を抽出した。

2.2 培地および植物ホルモン

3-5% (W/V) ショ糖を含む Linsmaier & Skoog (LS) 培地 (Linsmaier and Skoog, 1965) を基本培地とした。Gelrite を 0.3% (W/V) となるように加えて固体培地 (LS Gel 培地) を作成した。4-フルオロフェノキシ酢酸 (4FA), アブシシン酸 (ABA) およびジベレリン酸 (GA3) などの植物ホルモンを用いた。

2.3 Embryogenic カルス形成用 (Emc) 培地での培養

未熟果実から抽出した未熟胚を、 1×10^{-5} M 4FA を含む LS [5% (W/V) ショ糖] Gel 培地 (Emc 培地) に置床し、25°C で明期 16h (16L/8D) の培養器 (白色蛍光灯, 2500 lx) で 2-3 週間明所培養した。

2.4 Embryo 形成用 (Eb) 培地での培養

Emc 培地で培養したのち、 1.5×10^{-5} M ABA と 3×10^{-6} M GA3 を含む LS [5% (W/V) ショ糖] Gel 培地 (Eb 培地) に移植し、25°C の明所培養器で約 1-2 週間培養した。

2.5 植物体形成用 (Plt) 培地での培養

Eb 培地で培養したのち、LS [3% (W/V) ショ糖] Gel 培地 (Plt 培地) に移植し、25°C の明所培養器で培養した。

2.6 *in vitro* での花成誘導

Plt 培地において、25°C で 16h の長日条件 (16L/8D) で培養している植物を、一度だけ 16h の暗期を与

えたのち、もとの長日条件 (16L/8D) で培養した。

2.7 培養容器および実験条件

未熟胚の置床、および、初期不定胚形成から後期不定胚形成までの一連の実験は、直径 6 cm のプラスチックシャーレ内に調製した固体培地上に、2 切片の植物細胞組織を置床する条件で行なった。それぞれの実験条件当たり 8 枚のシャーレを用いた。また、幼植物体の形成や成長過程においては、直径 9 cm のプラスチックシャーレを用いた。植物が大きく生育した時点で、直径 8 cm, 高さ 13.5 cm の培養瓶に移植し、*in vitro* での花成誘導実験に用いた。

3. 結果および考察

3.1 初期不定胚の形成

未熟果実から抽出した未熟胚を Emc 培地に置床した日を実験開始日とした。Emc 培地で培養したのち Eb 培地に移して培養すると、約 3 週間で白色の“奥歯”様の組織が形成された (図 1A)。これを、初期不定胚と呼ぶことにした。

開花後 15 日前後の未熟果実から抽出した未熟胚を用いる限り、90% 以上の頻度で初期不定胚が形成された。一方、開花後 10 日より若い果実や開花後 25 日を過ぎた果実からは、ほとんど (5% 以下の頻度) 初期不定胚形成が見られなかった。

3.2 不定胚の成長

Eb 培地で培養したのち Plt 培地に移して培養すると、合計約 4 週間で“鳥のくちばし”様の組織が形成された (図 1B)。これを、中期不定胚と呼ぶことにした。Plt 培地で培養を続けると、合計約 5 週間で“壺”様の組織 (図 1C) が形成された。さらに明所で合計約 6-7 週間培養を続けると、組織は鮮やかな緑色を呈し、“胴長の壺”様の組織 (図 1D および図 1E) となった。これを、後期不定胚と呼ぶことにした。

未熟胚の置床、および、初期不定胚形成から後期不定胚形成までの一連の実験では、それぞれ 8 枚のシャーレを用いて、合計 3 回繰り返した。その結果、初期不定胚が形成されたすべての培養組織で、不定胚の成長が見られた。

3.3 植物体再生および *in vitro* での開花

Emc, Eb, および Plt 培地で合計約 2 ヶ月間培養すると幼植物体となった (図 1F)。形成された後期不定胚からは、ほぼ 100% の頻度で幼植物体が得られた。

茎と葉を有する幼植物体を新たな Plt 培地に移植して培養すると、主根が伸長したので (図 1G, 実験開始後

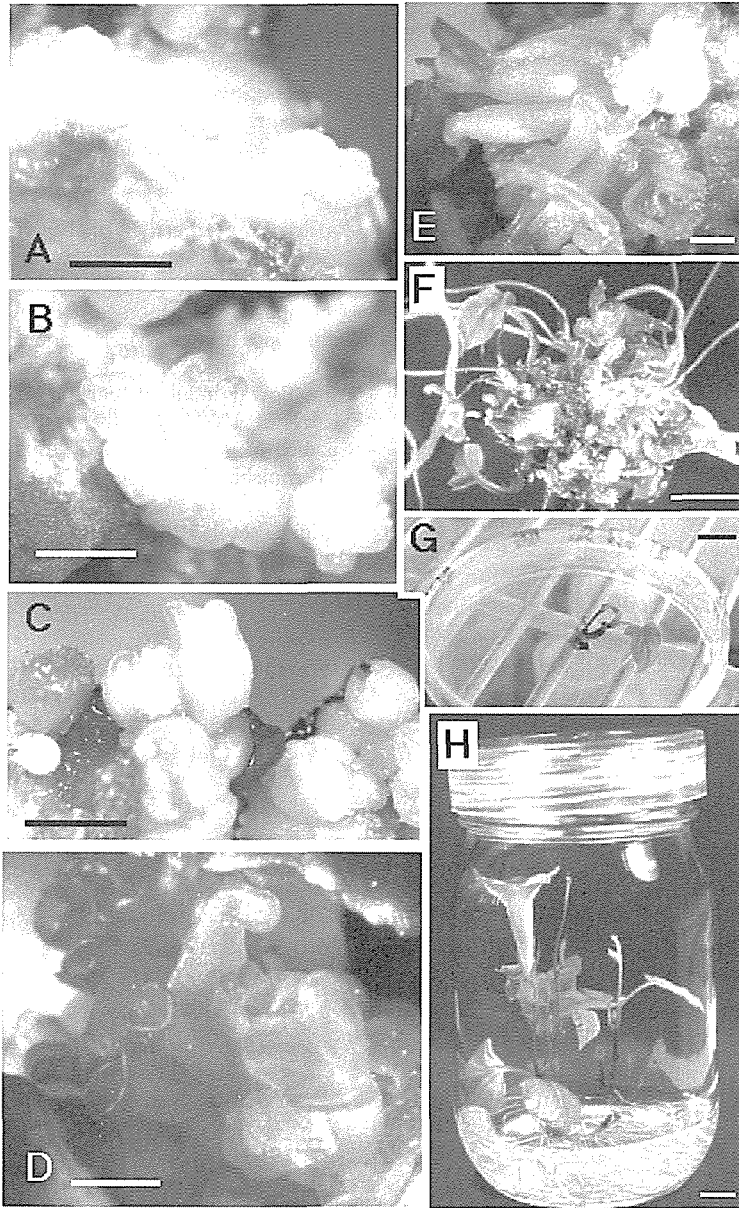


Fig. 1 Regeneration process for *Pharbitis nil* Choisy cv. Violet from immature zygotic embryos and photoperiodic induction of flowering *in vitro*. The photographs show adventitious embryos formed in Eb medium after culturing in Emc medium (A), adventitious embryos grown in Plt medium (B-E), regenerated shoots and plantlets (F, G), and regenerated plants flowering *in vitro* (H). Scale bars : (A-E), 1 mm; (F-H), 1 cm.

約 70 日), Plt 培地の入った培養容器に移植した, 根が多数伸長し植物体へと再生した時点で, 培養容器を暗所に 16 時間置き, 短日処理を施したのち, 16L/8D の長日条件下で培養を続けたところ, 実験開始から約 3 ヶ月

経過した時点で開花した (図 1H). アサガオ培養組織からの再生植物体における *in vitro* での開花率は約 80%であった.

遺伝子組換え植物を用いる実験では, 生物の多様性を

確保する観点から、組換え生物の拡散防止設備のない研究環境では、栽培に関わる多くの実験が規制の対象となる。従って、この *in vitro* での花成誘導法は、遺伝子組換え植物を用いた実験において、開花までの過程を閉鎖環境下で検討可能にし、花成に関わる遺伝子の機能解析を容易にすると考えられる。

4. 引用文献

- Imamura, S. 1967. Photoperiodic induction and the floral stimulus. In : Physiology of flowering in *Pharbitis nil*, ed. by Imamura, S., Japanese Society of Plant Physiologists, Tokyo, 15-28.
- Jia, S. R., Chua, N.-H. 1992. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryo culture of *Pharbitis nil*. *Plant Sci.* 87 : 215-223.
- Kim, K. C., Hur, Y., Maeng, J. 2003a. Isolation of a gene, PnFL-1, expressed in *Pharbitis* cotyledons during floral induction. *Mol. Cells* 16 : 54-59.
- Kim, S. J., Moon, J., Lee, I., Maeng, J., Kim, S. R. 2003b. Molecular cloning and expression analysis of a CONSTANS homologue, PnCOL1, from *Pharbitis nil*. *J. Exp. Bot.* 54 : 1879-1887.
- Liu, J., Yu, J., McIntosh, L., Kende, H., Zeevaart, J. A. 2001. Isolation of a CONSTANS ortholog from *Pharbitis nil* and its role in flowering. *Plant Physiol.* 125 : 1821-1830.
- Oguchi, T., Sage-Ono, K., Kamada, H., Ono, M. 2004. Characterization of transcriptional oscillation of an *Arabidopsis* homolog of PnC401 related to photoperiodic induction of flowering in *Pharbitis nil*. *Plant Cell Physiol.* 45 : 232-235.
- Ono, M., Sage-Ono, K., Kawakami, M., Hasebe, M., Ueda, K., Masuda, K., Inoue, M., Kamada, H. 2000. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of *Pharbitis nil*. *Plant Biotechnology* 17 : 211-216.
- Parfitt, D., Herbert, R. J., Rogers, H. J., Francis, D. 2004. Differential expression of putative floral genes in *Pharbitis nil* shoot apices cultured on glucose compared with sucrose. *J. Exp. Bot.* 55 : 2169-2177.
- Sage-Ono, K., Ono, M., Harada, H., Kamada, H. 1998. Accumulation of a clock-regulated transcript during flower-inductive darkness in *Pharbitis nil*. *Plant Physiol.* 116 : 1479-1485.
- Suzuki, M., Yamaguchi, S., Iida, T., Hashimoto, I., Teranishi, H., Mizoguchi, M., Yano, F., Todoroki, Y., Watanabe, N., Yokoyama, M. 2003. Endogenous alpha-ketol linolenic acid levels in short day-induced cotyledons are closely related to flower induction in *Pharbitis nil*. *Plant Cell Physiol.* 44 : 35-43.
- Trejgell, A., Tretyan, A., Nicos, D. 1998. Attempt at regeneration of *Pharbitis nil* from fragments of vegetative organs. *Acta Physiol. Plantarum* 20 : 161-166.
- Yoneda, Y. 1990. Japanese Morning Glory. In : Handbook of Plant Cell Culture, vol. 5, Ornamental Species, eds. by Ammirato, P. V. *et al.*, McGraw-Hill, New York, 509-533.