

# リンドウ科植物のプロトプラスト培養と植物体再分化

田中正美 小代寛正

## 緒言

生物資源部では1989年の部発足から、イネ科やリンドウ科などの作物についてプロトプラスト培養の可能性について試験を行ってきた。

リンドウは県花であるが、商品としての品種改良が遅れている。一般的に、切り花にはエゾリンドウやオオヤマリンドウが栽培されることが多く、交配によって品種改良されてきたが、改良の余地が大きい作物の一つと考えられる。<sup>3) 23) 24)</sup> また、リンドウ科植物でのプロトプラスト培養の研究は少なく、植物体再分化の例は極めて少ない。<sup>5) 7) 12) 14) 16) 25)</sup>

本試験では1990年から1993年にかけてリンドウ (*Gentiana scabra*)、エゾ系リンドウ (*Gentiana triflora* sp. v.)、トルコギキョウ (*Eustoma grandiflorum*) 等のリンドウ科 (*Gentianaceae*) 植物を用いて、葉肉細胞からのプロトプラストの単離条件、さらに、単離したプロトプラストを用いて、分裂や生育におよぼす培養条件等について検討した。その結果、三者ともプロトプラスト由来カルスから効率よく植物体再分化が可能になったので概要を報告する。

## 材料及び方法

### 1. 供試材料

リンドウ及びエゾ系リンドウは開花期の側芽の茎頂組織を、トルコギキョウの各品種は切り花収穫後の展開葉が2~4対のひこ生えの茎頂組織を無菌的に切り取り、ナフトレン酢酸 (NAA) 0.02mg/ℓ とベンジルアデニン (BA) 2mg/ℓ およびショ糖10g/ℓ を添加して、1/2に減じた液体MS培地 (Murashige and Skoog, 1962) に置床した。その後、25℃・16時間照明下で、毎分2~3回と緩やかな回転で約40日間培養し多芽体を形成させ、約30日間隔で継代した多芽体を必要に応じて滅菌ボックス内で生育させた植物体の成葉を用いた。<sup>20)</sup>

エゾ系リンドウでは供試葉の採取時期の違いや展開後

日数等による培養の難易について検討した。

## 2. プロトプラストの単離

### (1) 酵素液

用いた酵素液は、第1表に示したように各植物毎に作成して供試した。リンドウおよびトルコギキョウではセルラーゼオノズカR10 (C-R10) とセルラーゼオノズカRS (C-RS)、マセロザイムR10 (M-R10) およびペクトリアーゼY23 (P-Y23) をいくつか組合わせた。エゾリンドウでは、その他にドリセラーゼ (Dr) およびセルラーゼYC (C-YC) も組み合わせて、1段階法で検討した。酵素液には細胞の生存率を高めるため、塩加カルシウム ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) を1g/ℓ、浸透圧調整のためにマンニトールを90g/ℓ 加え、pH5.6 に調整して用いた。<sup>2) 10)</sup>

第1表 プロトプラストの単離に用いた酵素液組成

酵素液 No.	酵 素 名 (%)						使用作物名
	Co						
	RS	R10	YC	Ma-R10	P-Y-23	Dr	
C1	0.5				0.1		リンドウ, トルコギキョウ
C2		2		0.2			3作物
C3		2					リンドウ, トルコギキョウ
C4	2				0.3		リンドウ, トルコギキョウ
C5	2				0.5		リンドウ, トルコギキョウ
C6	1			0.5	0.1		エゾ系リンドウ
C7	1			0.1	0.1		エゾ系リンドウ
C8	1				0.05		エゾ系リンドウ
C9	2				0.1		1 エゾ系リンドウ
C10	2			0.5	0.1		エゾ系リンドウ
C11		0.5	1.5		0.1		エゾ系リンドウ
C12			2		0.1		エゾ系リンドウ

注-1) Co: セルラーゼオノズカ Ma: マセロザイム  
P: ペクトリアーゼ Dr: ドリセラーゼ

注-2) 9%マンニトールと0.1%CaCl<sub>2</sub> を添加し、pH5.6とした

### (2) 単離方法

プロトプラストの単離方法は、材料の葉片を塩化カルシウム1g/ℓ とマンニトール90g/ℓ を含む洗液に浸した

状態で幅約2~3mmに細断し、葉片1g当たり約10mlの割合で酵素液に浸漬し、25℃、60rpmで1~5時間振とうする短時間処理法で各酵素組成の違いについて検討した。また、25℃、暗黒下で16~20時間静置するオーバーナイトによる長時間処理法も試みた。

### (3) 精製の手法

単離後、プロトプラストの大きさに合わせ30または50ミクロンのナイロンメッシュで濾過した。

プロトプラストの精製は、回転後を600または900rpmとして遠心分離を行ってから上澄みの酵素液を捨て、洗浄液で3回の遠心洗浄した。この際の洗浄液への塩化カルシウムの添加効果および回転数と遠心時間の組み合わせについても検討した。

精製したプロトプラストの活性はエバンスブルーで染色して調査した。

## 3. プロトプラストの培養

### (1) 培地組成および更新方法

培地はMS培地を基本とし、培地濃度、特に窒素成分やNAAとBA等のホルモン濃度および糖としてショ糖濃度を変えて供試した。<sup>1)</sup>浸透圧調整のためマンニトールを90g/l加え、pH5.75に調整した液体培地で検討した(第2表)。

第2表 プロトプラスト培養に用いた改変MS培地

培地 No.	培地組成の変更	ホルモン濃度 mg/l		ショ糖 g/l	マンニトール g/l
		NAA	BA		
A1	MS (無修正)	1	1	3	90
A2	1/2MS	1	1	1.5	90
A3	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> -400 mg/l	2	1	1	90
A4	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> -400 mg/l	1	1.5	1	90
A5	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> -400 mg/l	2	1	1	60
A6	MS (無修正)	2	1	3	90

注) pH5.75

活性炭の効果については、エゾ系リンドウのプロトプラストを用いて検討した。

培地の更新方法については、リンドウのプロトプラストを用いて、培養開始からコロニー形成までの約3週間は7日間隔、その後のコロニー形成からカルス形成までの期間およびカルス増殖期間は10日間隔で行い、培地組成の変更や更新方法を検討した。

### (2) プロトプラスト密度

単離・精製したプロトプラストは $2 \times 10^4$ から $4 \times 10^4$ 個/mlの密度で液体培地に懸濁し、1シャーレ当たり5mlずつに分注して、密度との関係について分裂やカルス

化の程度を検討した。また、密度調整の際の洗浄液の混入程度も検討した。

### (3) 培養条件

培養のステージと照明条件についてはリンドウ、およびトルコギキョウのプロトプラストを用いて検討した。

培養容器は、60mmのプラスチックシャーレやガラスシャーレおよび深型ガラスシャーレ(深さ50mm)を用いて作業性や雑菌の混入程度について検討した。

## 4. 誘導したカルスからの植物体再分化培地

それぞれの植物のプロトプラスト培養によって形成された40日から60日の間のカルスを用いて、1回ないし数回にわたってMS培地を基本とした数種のホルモンを単独、または組み合わせで添加した培地に移植して検討した(第3表)。<sup>2)</sup>また、トルコギキョウでは、100日~430日までの長期培養したカルスでも再分化を試みた。培養は25℃・24時間照明下で行い、植物体再分化を図った。

苗化培地は、MS組成またはハイポネックス(Hi培地)3g/lの寒天培地か、支持体としてカット綿を用いた液体培地のいずれもホルモンフリー培地を使用し(第4表)、再生した植物体はカルスを除いて1本ごとに切り分けて、発根と苗化を図り、順化育成した。

第3表 再分化に用いた培地

培地 No.	ホルモン濃度 mg/l		支持体	培地 No.	ショ糖濃度 g/l		支持体
	BA	4PU			BA	4PU	
T-1	-	30	寒天	D18	8	60	ゲルライト
D1	6	30	ゲルライト	D19	10	60	ゲルライト
D2	6	45	ゲルライト	D20	12	60	ゲルライト
D3	6	60	ゲルライト	KT-1	1	30	寒天
D4	6	75	ゲルライト	KT-2	2	30	寒天
D5	6	30	寒天	KT-3	3	30	寒天
D6	6	45	寒天	KT-4	4	30	寒天
D7	6	60	寒天	KT-5	5	30	寒天
D8	6	75	寒天	KT-6	0.1	30	寒天
D9	4	30	ゲルライト	KT-7	0.2	30	寒天
D10	8	30	ゲルライト	KT-8	0.3	30	寒天
D11	10	30	ゲルライト	KT-9	0.4	30	寒天
D12	12	30	ゲルライト	KT-10	0.5	30	寒天
D17	4	60	ゲルライト	N-6		30	寒天

注) pH5.75

第4表 苗条化に用いた培地

培地 No.	基本培地	支持体
E1	MS	寒天
E2	MS	カット綿(液体)
E3	ハイポネックス 3g/l	寒天
E4		カット綿(液体)

5. トルコギキョウの品種間差

品種分化の進んでいるトルコギキョウについては、白扇、アーリーパープル、紫紺源氏の3品種を用いて、それらの品種間差について検討した。

なお、試験の順に検討を加えた各要因のうちで最も良い条件を次の試験に採用した。

結果及び考察

プロトプラスト培養法は、1個の体細胞からでも植物体を再生することができる植物のもつ全能性を利用した培養技術である。<sup>4)</sup>プロトプラストは植物細胞の細胞壁を取り去ったため、異種プロトプラストの融合による体細胞雑種の作出と同種プロトプラストの融合による倍数体の作出、遺伝子の取り込みによる形質転換作物の獲得、変異物質処理の影響拡大や植物体再生過程での変異体の利用など、育種面で重要な役割を果たすものと考えられている。特に、近年発達が著しい遺伝子工学の実用化のための遺伝子導入の受容体として、プロトプラスト培養技術の重要性は高い。<sup>9) (13) (17) (18)</sup>

いまではプロトプラスト培養はナス科やアブラナ科等の30科89種の作物で再生が可能になっている。さらに、ナス科等16科41種では異種間の雑種の作出に成功している。<sup>8)</sup>反面、まだ多数の植物で再分化はおろか、単離にも成功しておらず、プロトプラストの単離から植物体再分化までの技術開発は重要な課題である。このような観点から本試験を行った。

1. リンドウ

リンドウについては、プロトプラストの単離とその培養ならびに植物体再分化や苗化などについて検討を行った。

(1) プロトプラストの単離

プロトプラストの単離は、供試した5つの酵素液のすべてでみられ、C4の酵素液では、処理開始1時間後と最も早い時間から始まったが、残り4つの酵素液では2時間経過前後から単離し始めた。しかし、すべての酵素液で処理開始3.5~4時間で最大の単離状態となり、その後は時間の経過とともに少なくなった。これはプロトプラストの活性が低下し、一部は壊れやすくなったため、結果的に活性プロトプラストの数が少なくなったためと考えられた。供試した5種類の酵素液のうち、最も安定したのはC2の酵素液であり、25℃、60rpmで3.5~4時間の振とう処理をした場合、成葉1g当たり $10^5 \sim 10^6$ 個のプロトプラスト収量が得られた。また、振とう処理で安定した収量が得られた。C2の酵素液でのオーバーナイト処理で、タバコ等の作物より長い18~20時間処理で $10^6$

個と短時間処理法より安定した収量が得られた(第5表)。この方法は、遺伝子導入等の細胞操作を連続して実施することを考えた場合有効な方法と考えられる。

第5表 単離用酵素液がリンドウプロトプラストの収量に及ぼす影響

酵素液 No.	処理方法	経過時間												
		1	2	3	3.5	4	5	16	18	20				
C1	短時間	-	+	1	3	2	1							
C2	短時間	-	+	2	2~4	3~4	3							
C3	短時間	-	+	1	2	2~3	2							
C4	短時間	-	+	1	2	2	2~1							
C5	短時間	+	1	1	2~3	2	2~1							
C2	長時間							3~4	4~5	4				

注)-:  $10^2$  +:  $10^3$  1:  $10^4$  2:  $5 \times 10^4$  3:  $10^5$  4:  $10^6$  5:  $2 \times 10^6$  個

単離しプロトプラストは30ミクロン前後の大きさを示したため、30ミクロンのナイロンメッシュで濾過した。濾過したプロトプラストについて、洗浄液への0.1%の塩化カルシウムの添加は他の作物と同様にプロトプラストの生存に安定的に作用し、添加しない場合に比べ著しい効果が認められた(第6表)。

回転数と回転時間の組み合わせでは、600rpmの2分間または3.5分間処理より、900rpmの2分間処理が安定した収量を示した(第7表)。

第6表 洗浄液への塩化カルシウムの添加がリンドウプロトプラストの収量に及ぼす影響

塩化カルシウムの有無	プロトプラストの収量	
	個数	生葉1g/酵素液10ml
有	$10^5 \sim 10^6$	
無	$10^4$	

注) 酵素液: No.C2 処理時間: 3.5時間  
個数/生葉1g/酵素液10ml

第7表 洗浄時の回転数と回転時間がリンドウプロトプラストの収量に及ぼす影響

回転数 rpm	回転時間 min	プロトプラストの収量 個
600	2	$5 \times 10^4 \sim 10^5$
600	3.5	$10^5 \sim 10^6$
900	2	$10^6$

注) 酵素液: No.C2 処理時間: 3.5時間  
個数/生葉1g/酵素液10ml

第8表 培地の違いがリンドウプロトプラストの分裂とコロニーおよびカルス形成に及ぼす影響

培地 No.	分裂開始		コロニー形成		カルス形成の程度 (40日目)
	経過日数	程度	経過日数	程度	
A1	6	+-	16	+-	+-
A2	7	+-	18	+1	+-
A3	4	+1	15	+3	+3~+4
A4	4	+1	15	+1	+2

注) 分裂程度(ヶ/mm), +-:2~+1:10~ +2:20~  
 コロニー形成程度(ヶ/cm), +-:0~+1:10~ +2:20~ +3:50~  
 カルス形成程度(ヶ/cm), +1:5~+2:10~ +3:20~ +4:40~

第9表 マンニトール濃度の異なる培地への変更がリンドウプロトプラストのコロニーおよびカルス形成に及ぼす影響

培地 No.	分裂開始		コロニー形成		カルス形成の程度 (40日目)
	経過日数	程度	経過日数	程度	
A3	4~5	+1	15	+3	+3~+4
A5	4~5	+1	15	+3	+2~+3

注) 分裂程度(ヶ/mm), +-:2~+1:10~+2:20~  
 コロニー形成程度(ヶ/cm), +1:20~ +2:50~ +3:100~  
 カルス形成程度(ヶ/cm), +:5~ +2:10~ +3:20~ +4:40~

(2) プロトプラストの培養

培地は第2表に示したように、MS組成にマンニトール90g/lを添加した液を基本とし、組成濃度、特に窒素濃度とショ糖およびNAAとBAのホルモンバランスについて検討した。その結果、A1培地とMS組成およびショ糖濃度を半減したA2培地でわずかに分裂が認められたが、カルス形成までに至らなかった。しかし、A2培地ではわずかではあるが、コロニー形成が認められた。そこで、NH<sub>4</sub>N O<sub>3</sub>を400mg/lとさらに低減した改変MS培地にショ糖10g/lとし、ホルモンバランスの異なるA3培地とA4培地でいずれも分裂開始が早く、コロニー形成を経て2~3mm径のカルスを培養開始40日前後で形成した。特にNAA濃度を2mg/lに高めたA3培地では安定した生育経過を示したことからプロトプラストの分裂にはホルモンバランスも影響し、オオキシン濃度は高いほうが効果的であった(第8表)。

一般的には培養の経過と共に浸透圧調整剤であるマンニトール濃度を低下させることがよいとされるが、3回目の培養液更新にあたる培養開始21日目のコロニー形成期以降にマンニトール濃度を90g/lから60g/lに調整した培養液への変更は、培養開始40日目のカルス形成量を少なくした(第9表)。<sup>16)</sup>

培地の更新方法については、コロニー形成が安定する培養開始30日目に当たる4回目の更新以降に新鮮培養液に交換し、それまでは新鮮培養液を追加する更新方法がカルス形成に最も有効的であり、新鮮培養液の交換を早い回から実施するほどコロニーやカルスの形成が劣り、他の作物と異なった反応を示した(第10表)。このことは、培地のコンディショニング効果や培地環境の急変への反応の違い等興味深い問題と考えられる。<sup>17)</sup>

プロトプラスト密度については、 $2 \times 10^4$ から $4 \times 10^4$ 個/mlの密度で液体培地に懸濁して検討した。分裂開始はプロトプラスト密度で差はないが、コロニー形成は密度の最も低い $2 \times 10^4$  個/mlで著しく劣り、 $3 \times 10^4$  個/mlが安定した。カルス形成も同様の傾向となった。(第11表)。

第10表 培地の更新方法がリンドウプロトプラストのコロニーおよびカルス形成に及ぼす影響

培地の更新方法	コロニー形成		カルス形成の程度 (40日目)
	経過日数	程度	
2回目以降更新	19	+-	+~+3
3回目以降更新	15	+3	+2~+4
4回目以降更新	15	+3	+3~+4

注) コロニー形成程度(ヶ/cm), +1:20~ +2:50~ +3:100~  
 カルス形成程度(ヶ/cm), +:5~ +2:10~ +3:20~ +4:40~

第11表 リンドウのプロトプラスト密度が分裂開始、コロニーおよびカルス形成に及ぼす影響

プロトプラストの密度 個数/ml	分裂開始		コロニー形成		カルス形成の程度 (40日目)
	経過日数	程度	経過日数	程度	
$2 \times 10^4$	5	+1	15	+-	+-
$2.5 \times 10^4$	5	+1	14	+2	+2
$3 \times 10^4$	5	+1	15	+3	+3~+4
$4 \times 10^4$	4	+1	15	+2	+2~+3

注) 分裂程度(ヶ/mm), +-:2~+1:10~ +2:20~  
 コロニー形成程度(ヶ/cm), +1:20~ +2:50~ +3:100~  
 カルス形成程度(ヶ/cm), +:5~ +2:10~ +3:20~ +4:40~

第12表 培地に混入する洗浄液の量がリンドウプロトプラストのコロニー形成に及ぼす影響

洗浄液の量ml	0.7	1	1.5	2
コロニー形成の程度	+3	+3~+4	+3~+2	+2

注) A3培地4ml当たりの混入量、密度: $3 \times 10^4$  個  
 コロニー形成程度(ヶ/cm), +1:20~ +2:50~ +3:100~

第13表 プロトプラスト培養初期の光条件が分裂開始、コロニーおよびカルス形成に及ぼす影響

光条件	分裂開始		コロニー形成		カルス形成
	経過日数	程度	経過日数	程度	の程度 (40日目)
明	8	+	17	+	+
暗	5	+2	15	+3	+3~+4

注) 分裂程度(7/mm), +:2~+1:10 ~ +2:20~  
 コロニー形成程度(7/cm), +1:20~ +2:50~ +3:100~  
 カルス形成程度(7/cm), +:5~ +2:10~ +3:20~ +4:40~

第14表 培地の違いがリンドウカルスの再分化に及ぼす影響

培地 No.	形態形成		培地 No.	形態形成		
	カルス増殖 色	再分化 程度		カルス増殖 色	再分化 程度	
T-1	b~g	+2	D11	yg	+2	発根
D1	g	+4	D12	g	+1	-
D2	g~y	+3	D17	bg	+3	-
D3	g~y	+3	D18	b	+1	-
D4	b~g	+3	D19	bg	+1	-
D5	g~y	+3	D20	bg	+1	-
D6	g~y	+2	KT-1	yg	+2	-
D7	g	+2	KT-2	yg	+2	多芽体
D8	yg	+3	KT-3	yg	+2	シュート
D9	yg	+3	KT-4	yg	+1	-
D10	yg	+2	KT-5	yg	+2	-

注) カルソ色, g:緑 y:黄 yg:黄緑 b:淡褐 bg:緑褐  
 カルソ増殖(倍), +1:2~ +2:4~ +3:10~ +4:20~

第15表 単離用酵素液がエゾ系リンドウプロトプラストの収量に及ぼす影響

酵素液 No.	処理 方法	経過時間										
		1	2	2.5	3	3.5	4	5	16	18	20	
C2	短時間	1	6	10	14	15	12	5				
C6	短時間	2	6	11	8	3	3					
C7	短時間	1	2	2	2	2	1					
C8	短時間	1	2	2	1	-						
C9	短時間	1	2.5	8	6	2	2	1				
C10	短時間	1	5	10	6	2	3	1				
C11	短時間	1	6	12	13	8	6	2				
C12	短時間	1	4	6	4	3	1	-				
C2	長時間								20	22	14	

注)  $\times 10^5$  個/生葉1g

培養液への洗浄液の混入は、培養液 4 ml に対して洗浄液 1 ml 程度まではコロニー形成におよぼす影響は少なかったが、1.5 ml 以上の混入は培養液の相対濃度を必要以上に低下させたためコロニー形成に悪影響をおよぼし

たとえられた。(第12表)。

コロニー形成までの14日間の培養初期の光条件について検討した結果、1,000luxの24時間照明より暗黒条件下で分裂開始が早まり、コロニー形成やその後のカルス形成も安定した。(第13表)。

培養容器については、実験を開始した当初、多数の試験区を設定し、培地交換が頻繁な時期にコンタミネーションに悩まされたため、安全性と作業性の良いプロトコールを検討する中で、プラスチックシャーレや浅いガラスシャーレより深さ50mmの深型ガラスシャーレが雑菌の混入が少なく、取り扱いも容易であることが解った。

### (3) 植物体再分化培地と苗化培地

再分化培地は、MS培地に第3表に示したホルモン等を調整した培地を用いて検討した。

培養開始後40日目の径1~3mmのカルスを各培地に移植して再分化を図った。BA添加培地ではほとんどがカルスの増殖に止まったが、BA10mg/l添加のD11培地ではカルス増殖後に根の分化が見られた。一方、ホルクロルフェニユロン(4PU)を添加したKT2とKT3の培地では、移植後30日前後で不定芽が形成され、植物体の再生がみとめられた。<sup>9) 10)</sup>不定芽はさらに30日前後でしばしば10数本から30本前後の多芽体となった(第14表)。

苗化は、第4表に示したホルモンフリーの苗化培地にカルス部分を除いて置床することで約20日で発根が始まった。さらに30日前後培養し、十分に発根した幼苗は72穴のプラグポットとミスト灌水を利用することで順化は容易であった。

## 2. エゾ系リンドウ

エゾ系リンドウではリンドウに比べ、細胞分裂からカルス化までのプロトプラスト培養の過程が、しばしば不安定になったため、培養に供試する葉片の採取時期や展開日数およびカルスの褐変防止等について検討した。

### (1) プロトプラストの単離

プロトプラストの単離は、リンドウで供試した酵素液のほか、ドリセラゼ(Dr)およびセルラーゼYC(C-YC)を組合わせた7つの酵素液のいずれでもみられたが、リンドウと同様にC2酵素液が安定し、25°C、60rpmで振とう処理をした場合、3~3.5時間で成葉1g当たり14~15 $\times 10^5$ 個のプロトプラスト収量が得られた。また、振とう処理で安定した収量が得られたC2酵素液で16~18時間のオーバーナイト処理では2 $\times 10^6$ 個と短時間処理法より安定した収量が得られた(第15表)。

単離プロトプラストの濾過や洗浄、回転数と回転時間の組み合わせ等は、リンドウに準じた方法で行っても問題はなく、かつ、十分な活性プロトプラストが得られた。

第16表 培地組成および活性炭の添加がエゾ系リンドウプロトプラストの分裂、コロニーおよびカルス形成に及ぼす影響

培地 No.	活 性 炭		分 裂 開 始		コロニー形成		コロニーの褐変程度	カルス形成		カルスの褐変程度
	添加方法	添加割合	経過日数	程度	経過日数	程度		経過日数	程度	
A3	無		5	+	48	+4	+4			
	活性炭	0.75	4	+4	36	+3	-	46	+2	-
	活性炭ブロック	0.5	5	+-	40	+3	+4			
	活性炭ブロック	0.75	5	+2	46	+3	+3			
	活性炭ブロック	0.1	4	+4	42	+3	+-	68	+	-
A6	無		7	+-	50	+-				
	活性炭	0.75	4	+2	58	+3	+4			
	活性炭ブロック	0.5	5	+-	59	+2	+4			
	活性炭ブロック	0.75	5	+2	58	+2	+3	78	+3	+
	活性炭ブロック	0.1	5	+2	58	+3	+4	72	+2	+2

注) 添加割合: 活性炭 $ml$ /培地 $5 ml$ ; 分裂程度( $\eta/mm$ ), +1:10~ +2:20~ +3:50~ +4:100~ +5:300~  
 コロニー形成程度( $\eta/cm$ ), +1:20~ +2:50~ +3:100~ +4:200~  
 カルス形成程度( $\eta/cm$ ), +1~ +2:5~ +3:10~ +4:20~  
 褐変程度, -:0 +:-0~ +1:1割~ +2:3割~ +3:5割~

第17表 培養時期がエゾ系リンドウプロトプラストの分裂、コロニーおよびカルス形成に及ぼす影響

培養時期	分 裂 開 始		コロニー形成		コロニーの褐変程度	カルス形成		カルスの褐変程度
	経過日数	程度	経過日数	程度		経過日数	程度	
5月中旬	4	+4	33	+4	+1	65	+1	+-
6月中旬	4	+5	36	+5	-	65	+2	-
7月下旬	5	+2	46	+4	+2	76	+1	+
8月上旬	5	+2	44	+3	+1	63	+1	+
8月中旬	6	+2	42	+2	+3	82	+1	+1
9月中旬	5	+1	48	+2	+4	-		
10月中旬	7	+1	41	+1	+3	-		
11月中旬	6	+1	48	+3	+4	-		

注) 分裂程度( $\eta/mm$ ), +1:10~ +2:20~ +3:50~ +4:100~ +5:300~  
 コロニー形成程度( $\eta/cm$ ), +1:20~ +2:50~ +3:100~ +4:200~  
 カルス形成程度( $\eta/cm$ ), +1~ +2:5~ +3:10~ +4:20~  
 褐変程度, -:0 +:-0~ +1:1割~ +2:3割~ +3:5割~

(2) プロトプラストの培養

培地はリンドウで効果的であった $NH_4NO_3$ を $400mg/l$ としたA3培養液で分裂、コロニー、カルス形成が可能であった。しかし、カルスの褐変がしばしばみられ、リンドウほど安定性はみられなかった。そこで、褐変防止に利用される活性炭の添加効果について検討した。活性炭は、A3培地に1%の割合で添加するか、MS組成に $108g/l$ のグルコースと1%の活性炭を添加し、0.2%ゲルライトを加え、シャーレに5mmの厚さになるように調整して固化させ、適当なブロックの大きさに切り分けて供試した。また、活性炭ブロックの添加時期と培地組成を組み合わせて試験した結果、培地容量の1/10程度の添加が安定し、改変MS培地に培養の当初から添加した法がコロ

ニーやカルス形成の期間が短くなり、効果的であった(第16表)。

それでも、時により培養が不安定であったため、5月中旬から11月中旬にかけて約20日間隔で計8回培養し、時期別の安定度を調査した。その結果、6月中旬培養開始が最も安定し、9月以降はカルス形成が認められなかった(第17表)。

これは、供試植物を照度 $4,000lux$ 、24時間照明下で培養し、ほぼ30日間隔で培地を交換しているにもかかわらず、8月中旬前後から茎頂に花芽が分化したため、リンドウ体内のホルモン等のバランスが変化し、葉片の老化に伴う活性の低下によるものと推察された。<sup>21)</sup>

第18表 エゾ系リンドウの葉片の展開日数がプロトプラストの分裂、コロニーおよびカルス形成に及ぼす影響

展開日数	分裂開始		コロニー形成		コロニーの褐変程度	カルス形成		カルスの褐変程度
	経過日数	程度	経過日数	程度		経過日数	程度	
未展開	4	+4	38	+4	+1	65	+2	-
7日	4	+4	36	+5	+1	65	+2	-
15日	5	+4	38	+4	+2	62	+3	+
21日	4	+5	36	+4	+1	62	+3	+
28日	5	+4	40	+4	+2	65	+2	+
35日	7	+3	38	+3	+3	-		

注) 分裂程度(ヶ/mm), +3:50~ +4:100~ +5:300~  
 コロニー形成程度(ヶ/cm), +1:20~ +2:50~ +3:100~  
 カルス形成程度(ヶ/cm), +1~ +2:5~ +3:10~ +4:20~  
 褐変程度, -:0 +-:0~ +1:1割~ +2:3割~ +3:5割~

葉片の展開日数とプロトプラストの精製量を検討したが、葉片の展開から30日目程度では大きな問題は認められず、培養が可能であった(第18表)。

なお、培地の更新方法、プロトプラスト密度、培養初期の照明等の培養条件はリンドウに準じて行っても良好な結果が得られた。

(3) 植物体再分化培地と苗化培地

再分化培地は、リンドウと同様に、4PUを1~5 mg/l 添加したMS培地について検討し、培養開始後40日目~60日目の径1~3mmのカルスを各培地に移植して再分化を図った。第3表に示したKT2とKT3の培地で、移植後30日前後で不定芽を形成し、植物体の再生がみられた。不定芽はさらに30日前後でしばしば10数本から20本前後の多芽体となった(第19表)。

苗化は、リンドウと同じ培地を使用し、同様の手順で置床することで約20日で発根し、順化も容易であった。

3. トルコギキョウ

トルコギキョウには多数の品種があるが、一連の試験には白色の品種である白扇を供試した。また、品種間における差異についても検討した。

(1) プロトプラストの単離

プロトプラストの単離は、供試した3つの酵素液いづれでもみとめられたが、リンドウと同様にC2の酵素液が安定し、25℃、60rpm で振とう処理をした場合、3.5~4時間で成葉1g当たり10<sup>5</sup>個のプロトプラスト収量が得られた。また、C2酵素液で16~18時間のオーバーナイト処理では2×10<sup>6</sup>個と短時間処理法より安定した収量が得られた(第20表)。

回転数と時間の組み合わせでは、リンドウとは異なり600rpmの3分間処理が安定した収量を示した(第21表)。

単離したプロトプラストは40~50ミクロン前後の大きさを示したため、50ミクロンのナイロンメッシュで濾過した。

培養の材料については、ガラス室栽培のものと培養植物の葉片で検討し、培養植物で安定した収量となった。

単離プロトプラストの濾過や洗浄液等は、リンドウに準じた方法で問題なく、十分な活性プロトプラストが得られた。

第19表 再分化培地がエゾ系リンドウの植物体再生に及ぼす影響

培地 No.	形態形成		
	カルス色殖	加増殖程度	再分化
KT-1	yg	+2	-
KT-2	g	+2	不定芽
KT-3	g	+2	不定芽
KT-4	g	+3	-
KT-5	y	+3	-

注) 加増色, g:緑 y:黄 yg:黄緑  
 加増殖(倍), +1:2~ +2:4~ +3:10~

第20表 単離用酵素液がトルコギキョウ(白扇)プロトプラストの収量に及ぼす影響

酵素液 No.	処理方法	経過時間								
		1	2	3	3.5	4	5	14	16	18
C1	短時間	-	+3	+3	+2					
C2	短時間	-	+2	+3	+3~+4	+4	+3			
C3	短時間	-	+	+2	+2	+2	+			
C2	長時間							3~4	5	3

注)-:10<sup>2</sup> +-:10<sup>3</sup> 1:10<sup>4</sup> 2:5×10<sup>4</sup> 3:10<sup>5</sup> 4:10<sup>6</sup> 5:2×10<sup>6</sup>個

第21表 洗浄時の回転数と回転時間がトルコギキョウ（白扇）プロトプラストの収量に及ぼす影響

回転数 rpm	回転時間 min	プロトプラストの収量 (個数)
600	2	$10^5 \sim 10^6$
600	3.5	$5 \times 10^4 \sim 10^5 \sim 10^6$
900	2	$5 \times 10^4 \sim 10^5$
900	3.5	$5 \times 10^4 \sim 10^5$

注) 酵素液: No. C2 処理時間: 3.5時間  
個数/生葉1g/酵素液10ml

第22表 培地の違いがトルコギキョウプロトプラストの分裂とコロニーおよびカルス形成に及ぼす影響

培地 No.	分裂 開始		コロニー形成		カルス形成 の程度 (40日目)
	経過日数	程度	経過日数	程度	
A1	8	+	17	+	+
A2	8	+	18	+	+
A3	4	+	15	+3	+3~+4
A4	5	+	17	+	+

注) 分裂程度(ヶ/mm), +-:5以下 +:15 前後  
コロニー形成程度(ヶ/cm), +1:20~ +3:100~  
カルス形成程度(ヶ/cm), +:1~ +3:10~ +4:20~

第23表 再分化培地がトルコギキョウ（白扇）の植物体再生に及ぼす影響

培地 No.	カルス		形態形成	ホルモンフリー培地に 移植後の不定 芽形成の程度
	色	増殖程度		
T-1	yg	+1	不定芽・発根	+1
KT-6	yg	+2	カルス	+3
KT-7	g	+3	カルス	+3~+4
KT-8	g	+3	カルス	+2
KT-9	g	+4	カルス	+~+2
KT-10	y	+3~+4	カルス	+1
N-6	yg	+1	発根	-

注) 加色, g:緑 y:黄 yg:黄緑  
加増殖(倍), +1:2~ +2:4~ +3:10~ +4:20  
不定芽(本数), +1:2~ +2:3~ +3:5~ +4:8~13

第25表 トルコギキョウの品種間差がプロトプラスト収量、分裂やコロニーおよびカルス形成、さらに、再分化に及ぼす影響

品種名	プロトプラストの単離				プロトプラストの培養			再分化培養	
	経過時間				分裂 程度 10日目	コロニー-形式 程度 37日目	カルス形成 程度 65日目	再分化 カルス 率%	カルス 当たり シュト数
	2.5	3	3.5	4					
白扇	+2~+3	+3~+4	+3~+4	+2~+3	+2	+2	+3	75~90	3~15
ア-リ-バ-ル	+3	+3~+4	+4	+3	+3	+2	+3	63~95	5~13
紫紺源氏	+2~+3	+2~+4	+4	+2~+3	+2	+3	+3	50~88	1~15

注) プロトプラスト数, -: $10^2$  +:  $10^3$  1:  $10^4$  2:  $5 \times 10^4$  3:  $10^5$  4:  $10^6$  5:  $2 \times 10^6$  個  
分裂程度, +2:10ヶ以上/cm<sup>2</sup> +3:30ヶ以上/cm<sup>2</sup>  
コロニー形成程度, +2:50ヶ以上/cm<sup>2</sup> +3:100ヶ以上/cm<sup>2</sup>  
カルス形成程度, +3:10~20ヶ以上/cm<sup>2</sup>

第24表 トルコギキョウ（白扇）葉片プロトプラスト由来カルスの長期培養が植物体再生に及ぼす影響

培地 期間	カルス		形態形成	ホルモンフリー培地に 移植後の不定 芽形成の程度
	色	増殖程度		
46	yg~g	+3~+1	カルス	+3~+4
53	yg~g	+2~+3	カルス	+3
60	g	+3	カルス	+3~+4
100	g	+3	カルス	+2~+4
128	g	+4	カルス	+2~+3
176	yg	+3~+4	カルス	+4
235	yg	+1~+4	カルス	+2~+3
283	g	+2~+3	カルス	+3
312	yg~g	+3	カルス	+3~+4
340	yg	+3~+4	カルス	+3

注) 加色, g:緑 y:黄 yg:黄緑  
加増殖(倍), +1:2~ +2:4~ +3:10~ +4:20  
不定芽(本数), +2:3~ +3:5~ +4:8~13

(2) プロトプラストの培養

培地はリンドウで効果的であったNH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>を400mg/ℓとしたA3培養液で分裂、コロニー、カルス形成が可能であった(第22表)。

なお、培地の更新方法は、プロトプラスト密度、培養初期照明等の培養条件はリンドウに準じた方法で良好な結果が示された。

(3) 植物体再分化培地と苗化培地

再分化培地は、リンドウと同様に、4PUを0.1~0.5mg/ℓ添加したMS培地について検討し、培養開始後40日目~430日目の径1~5mmのカルスを各培地に移植した。いずれの濃度の4PU培地でもカルスは増殖したが、植物体の分化はみられなかった。しかし、4PU培地で約30日間培養後、ホルモンフリーのMS培地に移植することで10日目には不定芽が形成された。特に、4PU濃度が0.3mg/ℓの培地を経由したカルスで不定芽形成が著しく、後に多芽体となった(第23表)。また、カルス形成後100日目~430日までのカルスについて再分化をみた結果、長期培養カルスでも4PU培地で再分化が可能であることが解っ



た(第24表)。

苗化は、リンドウと同じ培地を使用し、同様の手順で置床することで約30日で発根した。また、順化も容易であった。

(4) 品種間差

白扇、アーリーパープルおよび紫紺源氏の3品種について検討した。プロトプラストの収量は3品種で大きな差は認められず、C2の酵素液で25℃、60rpmの振とう処理をした場合、3.5~4時間で成葉1g当たり $10^6$ 個のプロトプラストが得られ、培養にも差がなく、分裂やコロニーおよびカルス形成、さらに再分化は容易であった(第25表)。

カルスの大きさと再分化について白扇とアーリーパープルの2品種で4PU濃度を0.3mg/lと2mg/lとした培地で検討した結果、両品種とも4PU濃度を0.3mg/lの培地で不定芽の発生がよく、カルスは2~3mmの大きさのものが1mmや4~5mmのカルスより安定した(第26表)。

第26表 2品種のトルコギキョウカルスの形態と培地の違いが不定芽形成に及ぼす影響

品 種 名	培 地	カ ル ス		カ ル ス 増 殖	不 定 芽	
		大 小	色		形 成 率	平 均 芽 数
白 扇	KT-2	L	G	+4	27	3
		M	G	+4	80	2.8
	KT-8	L	G	+4	0	0
		M	G	+4	13	2
ア-リー-パー-プル	KT-2	L	G	+2	40	4.1
		M	G	+4	60	2.8
		S	G	+4	27	1.8
	KT-8	L	G	+4	0	0
		M	G	+3	27	5
		S	G	+4	0	0
	KT-2	L	YG	+4	20	1.5
		M	YG	+1	0	0
		S	YG	+	0	0
	KT-8	L	YG	+2	0	0
M		YG	+2	0	0	
	S	YG	+	0	0	

注) カルス色, G:緑 YG:黄緑  
カルスの大きさ, L:4~5mm M:2~3mm S:1mm  
カルスの程度, -(少)~+4(多)

摘 要

リンドウ、エゾ系リンドウおよびトルコギキョウの各リンドウ科植物について、培養植物の葉片からのプロトプラストの単離・精製条件、プロトプラスト培養の条件とプロトプラスト由来カルスからの植物再分化および苗化条件について検討し、一連の技術を確立した。

1) 葉片プロトプラストの単離は、2%セルラーオゼノズカR-10と0.2%マセロザイムR-10の液に、塩化カル

シウム(CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O)を1g/l、マンニトールを90g/l 加え、pH5.6に調整した酵素液で、25℃、60rpmの短時間処理及び暗所でのオーバーナイトによる長時間処理で安定した収量が得られた。短時間処理では、リンドウとトルコギキョウの各品種は3.5~4時間、エゾ系リンドウは3~3.5時間で生葉1g当たり $10^6$ 個、16~20時間の長時間処理では、リンドウは $10^6$ 個、エゾ系リンドウとトルコギキョウの各品種は $2 \times 10^6$ 個程度とより安定した収量が得られた。

2) プロトプラストの精製は、リンドウ及びエゾ系リンドウでは30ミクロンのナイロンメッシュで濾過し、900rpmの2分間遠心、トルコギキョウの各品種は50ミクロンで濾過し、600rpmの3分間遠心処理が安定した。この時に用いるマンニトール90g/lの洗浄液を塩化カルシウム(CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O)1g/lで調整するとプロトプラストの破壊が少なく安定した。また、洗浄液による3回の洗浄と遠心で酵素液を洗い流すことで、活性の高いプロトプラストが得られた。

3) プロトプラストの培養は、3作物ともMS培地のNH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>を400mg/lに改変し、ホルモンとしてNAA2mg/lとBA1mg/lを添加し、ショ糖濃度を1%に減じ、pH5.75に調整した液体培地で分裂、コロニー形成を経て、培養開始40日程度でカルス形成ができた。また、同様の培地でカルスの増殖と長期維持が可能であった。培地の更新は、コロニー形成の3週間までは新鮮培地の追加にとどめ、コロニー形成を待って培地の交換を行うことで安定した培養が可能であった。また、培養中の浸透圧の軽減は有効でなかったが、コロニー形成までの暗所培養や、エゾ系リンドウでの褐変防止のための活性炭ゲルライトブロックの効果は認められた。

プロトプラストの培養密度は、3作物とも $3 \times 10^4$ が安定した。

4) 植物体の再分化は、カルス径が2~3mmのプロトプラスト培養開始後40日~60日程度までのカルスをホルクロフェニユロン(4PU)を含むMS培地に移植することで可能であった。リンドウとエゾ系リンドウは2~3mg/lの4PU培地に30日程度の培養でカルスから不定芽を経て再分化個体が得られた。トルコギキョウの各品種は0.3mg/lの4PU培地に30日程度の培養後、MSホルモンフリー培地に移植すると2週間程度で高率に不定芽が得られた。

また、カルス形成後100日~430日までのトルコギキョウのカルスについて再分化をみた結果、長期培養カルスでも4PU培地で再分化が可能であった。

5) 苗化は、カルスを除いた不定芽をホルモンフリーのMS組成かハイポネックス3g/lの寒天またはカット綿

を支持体とする液体培地上で発根、苗化した。

順化は、ハイポネックスカット綿液体培地で培養することで根部の損傷を少なくでき、プラグポットとミスト灌水により容易に可能であった。

6) エゾ系リンドウでみられた、培養開始時期の違いによるプロトプラスト培養の難易は、それほどでないにしてもリンドウのプロトプラスト培養でも観察された。しかし、トルコギキョウでは観察できなかった。このことは、外気の影響の少ない25℃、4,000lux、24時間日長の培養室の栽培条件下でも、一定の生育量があるとある時期に花芽分化し、開花するリンドウやエゾ系リンドウの生体反応と関連し興味深い現象である。

#### 謝辞

本研究の当初から適切にご指導を頂いた当農業研究センター特別研究員新関宏夫氏(平成元年~平成4年)と本報告をとりまとめるに当たり、適切な御助言と御校閲を頂いた当農業研究センター農産園芸研究所特別研究員荒武義信氏の両氏に深く感謝します。

なお、本研究は、田中が1984年7月~9月の3ヶ月間、当時の農林水産省野菜試験場育種部育種第1研究室で依頼研究員として研修した際、育種第1研究室の高柳謙治室長のもとで、アスパラガス、ワケギ、イチゴ、スイカ等の葉やナス、スイカ、ツユクサ等の花卉など30種を越える多数の植物でプロトプラストの単離を試みたことに始まる。ここに感謝の意を表する。

#### 引用文献

- 1) 天野正之ら(1984):花きの細胞培養とその利用に関する研究 野菜試験場育種部研究年報 No.12 221-222
- 2) 日比忠明(1977):植物プロトプラストの調整法組織培養 Vol.3 No.4 17-23
- 3) 人見角一(1991):リンドウの品種改良と桃色花の育成 農耕と園芸 別冊 バイオホルティ 6 70-71
- 4) 駒嶺穆ら(1982):植物培養細胞の全能性 月刊組織培養 Vol.8 No.9 ニュー・サイエンス社
- 5) 国武久登・菅野清・三位正洋(1990):トルコギキョウのプロトプラストからの植物体再生. 育種学会雑誌 40(別1) 216-217
- 6) 村山徹ら(1993):リンドウ葉片からの効率的な不定芽形成および発根・順化の簡略化 園芸学雑誌 62(別2) 490-491
- 7) 長野県農業総合試験場(1991):リンドウの組織培養による育種技術の開発 104-107
- 8) 中島阜介(1994):細胞育種技術の進捗状況(1993年度) 生物資源研究所報告
- 9) 西尾剛ら(1986):組織培養とその利用 野菜試験場育種部研究年報 No.14 1-6
- 10) 西尾剛ら(1989):各種野菜におけるプロトプラスト培養技術の開発と改良 野菜・茶業試験場研究報告 A 第3号
- 11) 農林水産技術会議事務局(1978):高等植物における単細胞培養に関する研究 研究成果109
- 12) 岡山県農業試験場(1990):リンドウのプロトプラスト培養 バイオテクノロジー試験成績概要書 29
- 13) 大澤勝次ら(1983):細胞培養とその利用に関する研究 野菜試験場育種部研究年報 No.11 8-16
- 14) 佐賀県農業試験場(1991):リンドウ科植物の細胞育種に関する研究 バイオテクノロジー試験成績概要書 55-58
- 15) 城守寛ら(1993):リンドウの葉片カルスからの植物体再分化に関する研究 園芸学雑誌 62(別2) 492-493
- 16) 田部井豊ら(1988):ウリ科野菜の組織・細胞培養による育種素材の開発 野菜・茶業試験場野菜育種部研究年報 No.1 11-14
- 17) 高柳謙治ら(1985):細胞培養とその利用に関する研究 野菜試験場育種部研究年報 No.12 8-18
- 18) 高柳謙治ら(1986):細胞培養とその利用 野菜試験場育種部研究年報 No.13 1-8
- 19) 田中正美ら(1992):リンドウ葉肉プロトプラストの単離と再分化 九州農業研究 第55号 九州農業試験研究機関協議会 -196-
- 20) 田中正美ら(1994):回転培養を利用した多芽体による園芸作物の大量増殖技術 熊本県農業研究センター 研究報告 第4号 64-85
- 21) 谷本静史(1989):In vitro培養での花芽分化 植物細胞工学 Vol.1 No.2 35-41
- 22) 関谷次郎(1986):高等植物細胞培養の基本技術 植物バイオテクノロジー 現代社会 増刊5 山田康之・岡田吉美 6-15
- 23) 吉池貞蔵(1990):切花リンドウの発展. 新花卉 146号 34-38
- 24) 吉池貞蔵(1991):リンドウの育種 育種学会雑誌 41(別2) 564-567
- 25) Yoshihito Takahata and Hiroshi Jomori (1989):Plant Regeneration from Mesophyll Protoplasts of Gentiana. Plant Tissue Culture Letters,6(1),19-21

## Summary

### Culture and Plant Regeneration of Leaf Mesophyll Protoplasts in Gentianaceae

Masami TANAKA and Tomomasa SHODAI

We have succeeded in the regeneration of plants from leaf mesophyll protoplasts of Gentianaceae. Protoplasts were isolated from in vitro - grown plants of two genus of *Gentiana scabra*, *G. triflora* spv. and *Eustoma grandiflorum* sp., using an enzyme of 2% Cellulase Onozuka R10 and 0.2% Macerozyme R10 containing 90g/ℓ mannitol, 0.1% CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, and were successfully cultured in a modified MS liquid medium (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> - 400mg/ℓ) containing 2mg/ℓ BA, 1mg/ℓ NAA, 10g/ℓ sucrose. Cell division began four days after the culture, and callus formation occurred within tharthy days. *Gentiana* genus callus were transferred to MS agar medium containing with 3mg/ℓ 4PU to induce shoots. When *Eustoma* sp. callus were transferred to MS agar medium with 0.3mg/ℓ 4PU, then transferred again to MS hormone - free medium, many adventitious shoots and regenerated plants were obtained. The induced shoots finally developed into intact plants on MS hormone - free medium.