シクラメン体細胞胚からの植物体再生に及ぼす培地中の窒素源と ジェランガム濃度の影響

高村武二郎・芋瀬裕香・名木田由香・田中道男

香川大学農学部 761-0795 香川県木田郡三木町池戸 2393

Effects of Nitrogen Source and Gellan-gum Concentration in Medium on Plant Regeneration from Somatic Embryos in Cyclamen (*Cyclamen persicum* Mill.).

Takejiro TAKAMURA, Yuka IMOSE, Yuka NAGITA and Michio TANAKA

Faculty of Agriculture, Kagawa University, 2393 Ikenobe, Miki-Cho, Kita-gun, Kagawa 761-0795, Japan

Abstract

We investigate the effects of nitrogen source in medium on plant regeneration from somatic embryos in cyclamen (*Cyclamen persicum* Mill.). Nitrate was essential for germination of somatic embryos, since no germination was observed on the medium without nitrate except for a small quantity of vitamins. Somatic embryos could effectively germinate on half-strength modified MS media containing either 20 mM KNO₃ or 2 mM NH₄Cl + 18 mM KNO₃. The effects of gellan gum concentration on plant regeneration from the somatic embryos were also investigated. The greatest number of plantlets with roots and leaves developed on media containing 1.0% gellan gum. No hyperhydric plants were observed in media containing 1.0 or 2.0% gellan gum, and the percentage of hyperhydric plants was highest in the media containing 0.25% gellan gum.

Keywords: cyclamen, gellan gum, hyperhydricity, nitrogen source, somatic embryo

緒 言

植物の大量増殖において、体細胞胚形成を利用した方法は、単細胞起源であることや高い増殖効率が得られる利点から、種苗生産や遺伝資源開発に応用する価値が高いとされており (Ammirato, 1983), シクラメンにおいても、体細胞胚形成による植物体再生が多く報告されている (Fersing *et al.*, 1982; Wicart *et al.*, 1984; Otani and Shimada, 1991; Kiviharju *et al.*, 1992; Oohashi *et al.*, 1992; Takamura *et al.*, 1995a, 1995b; Kreuger *et al.*, 1995; Takamura and

Tanaka, 1996; Winkelmann *et al.*, 1998; Hohe *et al.*, 1999a, 1999b, 2001).

シクラメンの体細胞胚経由の植物体再生には、エンブリオジェニックカルス誘導、体細胞胚誘導および植物体再生の三つの主なステージがある。すなわち、植物体再生の効率化には、エンブリオジェニックカルスや体細胞胚の誘導効率のみならず、体細胞胚からの植物体再生効率の向上が重要である。

Takamura *et al.* (2003) は、シクラメンの体細胞胚の発芽には 20℃が、発芽後の生育には 15℃が適していたものの、正常な植物体に生育した体細胞胚の割合は低く、体細胞胚から植物体への再生効率を向上させるための培養環境や培地成分を検討し、再生効率を向上させる必要があると報告しているが、その改善に関する詳細な報告は見あたらない。たとえば、体細胞胚の生育に大きく影響すると考えられ

2005 年 8 月 11 日受付

2005 年 11 月 30 日受理

Corresponding author: Takejiro Takamura

(take@ag.kagawa-u.ac.jp)

る培地中の窒素源に関して、シクラメンの体細胞胚誘導に及ぼす影響についての報告はあるが (Kiviharju *et al.*, 1992; Takamura *et al.*, 1999), 体細胞胚からの植物体再生に及ぼす影響については詳細な検討は行われていない。また、ゲル化剤の濃度が、体細胞胚形成および体細胞胚の生育に与える影響についての報告はいくつかあるが (Saito *et al.*, 1991; Saito and Nishimura, 1994; Nagasawa *et al.*, 1999), シクラメンの体細胞胚の発芽および生育に及ぼすゲル化剤の濃度の影響も詳細には検討されていない。

そこで本報では、シクラメンの体細胞胚からの植物体再生に及ぼす培地中の窒素源およびゼランガム濃度の影響を調査した。

材料および方法

1. 体細胞胚からの植物体再生に及ぼす培地中の窒素源の影響

pH を 5.8 に調整した $5.0 \mu\text{M}$ 2, 4-D, $0.5 \mu\text{M}$ カイネチン, 6% ショ糖および 0.2% ジェランガム (三栄源エフ・エフ・アイ) を含む MS 培地 (Murashige and Skoog, 1962) をエンブリオジェニックカルの誘導に用いた。

F₁ (‘アンネケ’ × ‘ピュアホワイト’) の黄化葉柄由来の体細胞胚から発達した小植物体の塊茎を分割して置床し, 4 週間後に誘導されたエンブリオジェニックカルスを 6% ショ糖および 0.2% ジェランガムを含む植物生長調整物質無添加の MS 培地に移植して得られた直径約 1 mm の体細胞胚を外植体として供試した。

培養容器は 500 ml のガラス製ボトルを用い, 透明樹脂 (ポリメチルペンテン) 製のスクリュキャップに直径 3 mm の穴を開け, ミリシール (フロロカーボン製メンブレンフィルター; 孔径 $0.5 \mu\text{m}$, 日本ミリポア) を接着した蓋を用いた。この培養容器 (BOS) に培地を 100 ml ずつ注入し, 外植体を 1 か所に 5 個ずつ, 16 か所計 80 個の体細胞胚を供試した。

培地には, MS 培地 (Murashige and Skoog, 1962) のアンモニア態窒素源である硝酸アンモニウムを塩化アンモニウムに置きかえ, アンモニア態または硝酸態窒素濃度を変化させるとともに窒素源以外の成分を 1/2 濃度にした種々の修正

1/2MS 培地 (Table 1) を用いた。また, 通常の 1/2MS 培地も用いた。いずれの培地においても 3% ショ糖および 0.25% ジェランガムを添加し, オートクレーブ滅菌前に pH 5.8 に調整した後, 外植体を 20℃ 暗黒下で 5 週間培養し, さらに 20℃, 16 時間日長 ($34 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 下で 4 週間培養して, 体細胞胚の発芽および生育を調査した。なお, 実験は 2 反復行った。

2. 体細胞胚からの植物体再生に及ぼす培地のゼランガム濃度の影響

直径約 1 mm の F₁ (‘アンネケ’ × ‘ピュアホワイト’) の体細胞胚を外植体とし, 実験 1 に準じて培地に置床した。500 ml の BOS を用い, 培地には 3% ショ糖および異なる濃度のゼランガム (0.25, 0.5, 1.0, 2.0%) を含む植物生長調整物質無添加の 1/2MS 培地を用いた。培地は pH 5.8 に調整した。外植体は, 20℃, 暗黒下で 5 週間培養した後, 20℃ 16 時間日長 ($34 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 下でさらに 4 週間培養し, 体細胞胚の発芽および生育を調査した。各処理区 80 個の外植体を供試し, 実験は 2 反復した。

結果および考察

修正 1/2MS 培地を用いて体細胞胚からの植物体再生に及ぼす培地中のアンモニア態窒素と硝酸態窒素の濃度比の影響を調査した結果, アンモニア態窒素濃度が高く硝酸態窒素濃度が低い 1/2M-MS4 および微量のビタミン類以外に硝酸態窒素源の硝酸カリウムを含まない 1/2M-MS5 培地ではいずれにおいても葉を分化した体細胞胚がほとんどまたは全く認められなかった (Table 2, Fig. 1)。また, これらの培地では褐変枯死した体細胞胚も認められた。Asao *et al.* (1991) は, アンモニア態窒素がアスパラガスにおける体細胞胚からの植物体再生を抑制することを示唆しているが, シクラメンにおいても高濃度または硝酸態窒素に対して高い割合のアン

Table 2 Effects of nitrogen source on plant regeneration from somatic embryos in cyclamen F₁ (‘Anneke’ × ‘Pure White’).

Medium	Percent plants with leaves and roots	Percent embryos died
1/2M-MS1	54.4 ± 3.1	0
1/2M-MS2	67.6 ± 11.3	0
1/2M-MS3	30.0 ± 15.0	0
1/2M-MS4	0.6 ± 0.6	2.6 ± 1.3
1/2M-MS5	0	5.7 ± 4.4
1/2MS	10.7 ± 6.9	0

Means of two replications ± standard error are shown.

Table 1 Modified 1/2 MS media used in this study.

Medium	NH ₄ Cl (mM)	KNO ₃ (mM)
1/2M-MS1	0	20
1/2M-MS2	2	18
1/2M-MS3	10	10
1/2M-MS4	18	2
1/2M-MS5	20	0

Fig. 1 Plant regeneration from the somatic embryos of cyclamen F_1 ('Anneke' × 'Pure White') on modified 1/2MS medium.

モニア態窒素は体細胞胚からの植物体再生を著しく抑制することが明らかになった。一方、アンモニア態窒素と比較して

Table 3 Effects of the concentration of gellan gum on plant regeneration from somatic embryos in cyclamen F_1 ('Anneke' × 'Pure White').

Conc. gellan gum (%)	Percent plants with leaves and roots	Percent embryos died	Percent hyperhydric plants ^z
0.25	12.5 ± 5.0	0	11.9 ± 4.8
0.50	36.9 ± 4.4	0	3.8 ± 3.8
1.00	46.9 ± 3.1	0	0
2.00	23.8 ± 1.3	5.7 ± 4.4	0

Means of two replications ± standard error are shown.

^z(No. of hyperhydric plants/No. of plants with leaves and roots) × 100.

硝酸態窒素の割合が高いまたは同等である 1/2M-MS1, 1/2M-MS2 および 1/2M-MS3 培地では褐変枯死した体細胞胚は認められず、根および葉の両方を形成した体細胞胚が比較的多く形成された。特に微量元素のビタミン類を除く窒素源のほとんどまたはすべてが硝酸態である 1/2M-MS2 および 1/2M-MS1 培地においては、根および葉を形成した体細胞胚の割合が 1/2MS 培地と比較しても明らかに高い値を示した。以上のことから、シクラメンの体細胞胚からの植物体再生には、窒素源の多くが硝酸態である培地が適当であると思われる。Takamura *et al.*, (1999) は、シクラメンの体細胞胚形成には培地中のアンモニア態窒素が必須であると報告しているが、本研究の結果から体細胞胚の正常な発芽にはむしろ硝酸態窒素が重要であり、シクラメンの体細胞胚形成を利用した植物体再生においては、培養ステージにより培地中の最適窒素形態が異なることが示唆される。

Fig. 2 Plant regeneration from the somatic embryos of cyclamen F_1 ('Anneke' × 'Pure White') on 1/2MS medium containing 0.25, 0.5, 1.0 or 2.0% gellan gum.

Nagasawa *et al.* (1999) は、ボンカンの体細胞胚の発芽において、低濃度でのジェランガム区では体細胞胚の発芽率は低くなり、ジェランガム濃度が 0.8% までは濃度に比例して発芽率が高くなるが、1.0% 以上の濃度では、発芽が抑制されると報告している。本研究でも、シクラメンの体細胞胚の発芽に培地中のジェランガム濃度が影響し、1.0% まではジェランガム濃度が高くなるにつれて根および葉の両方を有する個体に生育した体細胞胚の割合も高くなったものの、2.0% ジェランガム区では 1.0% 区と比較して明らかに体細胞胚の発芽が抑制された (Table 3, Fig. 2)。通常、1/2MS 培地では 0.25% 程度のジェランガムが用いられることが多く、シクラメンにおいても 0.25% ジェランガムを添加した 1/2MS 培地が体細胞胚の発芽に用いられた報告があるが (Takamura *et al.*, 1995)、本研究の結果からシクラメンの体細胞胚からの植物体再生には 1.0% ジェランガムの添加が適当であると示唆される。また、Saito *et al.* (1991) はアスパラガスの、Saito and Nishimura (1994) はナスの体細胞胚形成において、通気性のある容器内で高濃度のゲル化剤を用いることによって水浸状の体細胞胚の割合が減少することを報告しているが、本研究においてもジェランガム濃度が高くなるにつれて水浸状の個体、すなわちハイパーハイドリシティー個体の割合が減少し、1.0 または 2.0% ジェランガム区ではハイパーハイドリシティー個体は観察されなかった。なお、0.25 および 0.5% ジェランガム区でもハイパーハイドリシティー個体の割合がそれほど高くなかったのは、Takamura *et al.* (1995) が報告しているように、培養容器に通気性があったためハイパーハイドリシティーが抑制されたものと推測される。以上のことから、シクラメンの体細胞胚からの植物体再生においても、培地中の高濃度のゲル化剤がハイパーハイドリシティーの減少に効果的であることが示唆された。しかしながら、2.0% ジェランガム区ではハイパーハイドリシティーは抑制されたものの、根および葉の両方を有する個体の割合は低くなり、発芽せずに枯死する体細胞胚も認められたことから (Table 3)、通常用いられている濃度 (0.25%) の 4 倍である 1.0% ジェランガムを添加した培地が体細胞胚からの植物体再生に最も適していると考えられた。

本研究の結果、シクラメン体細胞胚からの植物体再生には窒素形態およびジェランガムの濃度が大きく影響し、これらの諸条件の改良により体細胞胚からの植物体再生が改善できることが示唆された。また、発芽・発根したすべての体細胞胚が塊茎を肥大させており (データ未掲載)、萌芽能力のある塊茎の状態で培養苗を供給する傾向が高まっているシクラメンの培養苗生産においても、本研究で得られた知見が活用できるものと考えられる。しかしながら、本研究では、窒素源とジェランガムの濃度の影響の相互作用は検討されていない。今後、培養容器内のガス環境等、窒素源およびジェランガム

の濃度以外の条件も含めて、体細胞胚の発芽と生育に及ぼす諸条件の相互作用について検討を行うことにより、シクラメンの体細胞胚形成による植物体再生がさらに効率化できるものと期待される。

摘 要

シクラメン体細胞胚からの植物体再生に及ぼす培地中の窒素形態の影響を調査した結果、微量のビタミン類以外に硝酸態窒素を含まない培地では体細胞胚が発芽せず、体細胞胚の発芽には硝酸態窒素が必須であると考えられた。体細胞胚の発芽は、1/2MS 培地の窒素源を 20 mM 硝酸カリウム、または 2 mM 塩化アンモニウムと 18 mM 硝酸カリウムに置き換えた修正 1/2MS 培地で最も促進された。また、体細胞胚からの植物体再生に及ぼす培地中のジェランガム濃度の影響を調査した結果、根および葉を有する個体数は 1.0% ジェランガム添加培地で最も大きな値を示した。1.0 および 2.0% ジェランガム添加培地ではハイパーハイドリック個体の形成は認められなかった。一方、0.25% ジェランガム添加培地でハイパーハイドリック個体の割合が最も高くなった。

引用文献

- Ammirato, P. V. 1983. Embryogenesis. In: Handbook of plant cell culture vol. 1, ed. by Evans, D. A., Sharp, W. R., Ammirato, P. V., Yamada, Y. Macmillan Publishing Co., New York, 82–113.
- Asao, H. Arai, S., Kobatake, H. 1991. Micropropagation of *Asparagus officinalis* L. through somatic embryos (アスパラガスの不定胚利用による大量増殖). Bull. Nara. Agri. Expt. Sta. 22: 1–8 (In Japanese with English summary).
- Fersing, J., Mouras, H., Lutz, H. 1982. Première étape vers une multiplication végétative industrielle du *Cyclamen* per la culture «in vitro». Pèpin Hort. Maraîchers 224: 27–30.
- Hohe, A., Winkelmann, T., Schwenkel H. -G. 1999a. CO₂ accumulation in bioreactor suspension cultures of *Cyclamen persicum* Mill. and its effect on cell growth and regeneration of somatic embryos. Plant Cell Rep. 18: 863–867.
- Hohe, A., Winkelmann, T., Schwenkel H. -G. 1999b. The effect of oxygen partial pressure in bioreactors on cell proliferation and subsequent differentiation of somatic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 59: 39–45.
- Hohe, A., Winkelmann, T., Schwenkel H. -G. 2001. Development of somatic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. in liquid culture. Gartenbauwissenschaft 66:

- 219–224.
- Kiviharju, E., Tuominen, U., Törmälä, T. 1992. The effect of explant material on Somatic embryogenesis of *Cyclamen persicum* Mill. Plant cell Tiss. Org. Cult. 28: 187–194.
- Kreuger, M., Postma, E., Brouwer, Y., van Holst, G. J. 1995. Somatic embryogenesis of *Cyclamen persicum* in liquid medium. Physiol. Plant. 94: 605–612.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473–497.
- Nagasawa, K., Tomomatsu, K., Kunitake, H., Komatsu, H. 1999. Effect of in vitro environmental conditions on somatic embryogenesis and its germination from nucellar calli of 'Ohta' Ponkan (*Citrus reticulata* Blanco) ('太田' ポンカン (*Citrus reticulata* Blanco.) の珠心カルスからの体細胞胚形成と発芽に及ぼす培養環境の影響). Proc. School Agr. Kyushu Tokai Univ. 18: 11–18 (In Japanese with English summary).
- Oohashi, K., Wakui, T., Yonai, S. 1992. In vitro mass propagation of *Cyclamen persicum* Mill. (3) Propagation from root tissues via somatic embryo (シクラメンの組織培養による大量増殖 (第3報) 不定胚利用による増殖). Bull. Tochigi Agr. Exp. Stn. 39: 57–74 (In Japanese with English summary).
- Otani, M., Shimada, T. 1991. Somatic embryogenesis and plant regeneration from *Cyclamen persicum* Mill. leaf cultures. Plant Tissue Cult. Lett. 8: 121–123.
- Saito, T., Nishimura, S. 1994. Improved culture condition for somatic embryogenesis using an aseptic ventilative filter in eggplants (*Solanum melongena* L.). Plant Sci. 102: 205–211.
- Saito, T., Nishizawa, S., Nishimura, S. 1991. Improved culture conditions for somatic embryogenesis from *Asparagus officinalis* L. using an aseptic ventilative filter. Plant Cell Rep. 102: 230–234.
- Takamura, T., Miyajima, I., Matsuo, E. 1995a. Somatic embryogenesis of *Cyclamen persicum* Mill. 'Anneke' from aseptic seedlings. Plant Cell Rep. 15: 22–25.
- Takamura, T., Nii, K., Tanaka, M. 1995b. The effects of medium substrate and culture vessel on the morphogenesis from somatic embryos in cyclamen (*Cyclamen persicum* Mill.) (シクラメン体細胞胚からの形態形成に及ぼす培地支持体と培養容器の影響). J. Japan. Soc. Hort. Sci. 64 (Suppl. 1): 528–529 (In Japanese).
- Takamura, T., Tanaka, M. 1996. Somatic embryogenesis from the etiolated petiole of cyclamen (*Cyclamen persicum* Mill.). Plant Tissue Cult. Lett. 13: 43–48.
- Takamura, T., Nagita, Y., Tanaka, M. 1999. Effects of nitrogen source in medium on the somatic embryogenesis of cyclamen (シクラメンの体細胞胚形成に及ぼす培地中の窒素源の影響). J. Japan. Soc. Hort. Sci. 64 (Suppl. 1): 479. (In Japanese).
- Takamura, T., Nagita, Y., Tanaka, M. 2003. Effects of temperature on in vitro plant regeneration through somatic embryogenesis in *Cyclamen persicum* mill (体細胞胚形成を経由したシクラメンの in vitro での植物体再生に及ぼす温度の影響). Hort. Res. (Japan) 2: 25–28 (In Japanese with English summary).
- Wicart, G., Mouras, A., Lutz, A. 1984. Histological study of organogenesis and embryogenesis in *Cyclamen persicum* Mill. tissue cultures: Evidence for a single organogenetic pattern. Protoplasma 119: 159–167.
- Winkelmann, T., Hohe, A., Schwenkel H. -G. 1998. Establishing embryogenic suspension cultures in *Cyclamen persicum* 'Purple Flamed' . Adv. Hort. Sci., 12: 25–30.