

アイズプラント (*Mesembryanthemum crystallinum*) の再分化及び 再生苗条の生長に及ぼすウレア系サイトカイニン CPPU 及び TDZ の影響

砂川 春樹・東江 栄・牧志 佑子*・梅本真紀子・野瀬 昭博

(熱帯作物改良学研究室)

平成17年9月30日 受理

Effect of the Phenylurea Cytokinins CPPU and TDZ on the Regeneration
and the Growth of Adventitious Shoots of *Mesembryanthemum crystallinum*

Haruki SUNAGAWA, Sakae AGARIE, Yuko MAKISHI*, Makiko UMEMOTO, Akihiro NOSE

(Laboratory of Tropical Crop Science)

Received September 30, 2005

Summary

Mesembryanthemum crystallinum L. (the common ice plant) has been used as a model plant to study on the regulatory properties in Crassulacean acid metabolism (CAM) and tolerance to abiotic stresses. However the transgenic procedure has not been established in this species due to recalcitrancy for in vitro regeneration. Here we have assessed the effects of synthetic cytokinins *N*-(2-chloro-4-pyridyl)-*N'*-phenylurea (CPPU) and *N*-phenyl-*N'*-1, 2, 3, -thidiazol-5-ylurea (TDZ) on the induction and the growth of adventitious shoot from hypocotyl and cotyledonary node in *M. crystallinum*. Although callus formation occurred on hypocotyl explants, no adventitious shoots were regenerated. The adventitious shoots were obtained only from the cotyledonary node. The TDZ were more effective for *in vitro* shoot regeneration and morphogenesis of the adventitious shoots than CPPU and benzyladenine. Exogenous application of cytokinin alone to the medium has resulted in the increase of the fresh weight and the higher regeneration rate than the other treatments. We have found that the 2.5 mg/L of TDZ induced the highest number of multiple shoots from single explant. The regenerated shoots were rooted on the MS medium within one month, and it produced more roots by the replacement of the agar medium with vermiculite or Florialite. This simple, reproducible and rapid regeneration system may prove useful for producing transgenic plants of *M. crystallinum*.

Key words: callus, cotyledonary node, regeneration, thidiazuron

緒 言

アイズプラント (*Mesembryanthemum crystallinum*) は、南アフリカ原産のザクロソウ科マツバギク属の一年性草本で、塩類濃度の高い土壌で生育できる塩生植物である。本種の耐塩性は

* 現在沖縄県宮古農業改良普及センター

高く、海水と同程度の塩濃度でも正常にライフサイクルを完結する。アイスプラントのストレス耐性を高めている特性の一つに、光合成型の変換が挙げられる。本種は乾燥や塩ストレス等の環境におかれると、光合成型をイネ、ムギ等の行うC3型から砂漠植物の行うCAM型へ変換し、ストレス耐性を獲得する。このような特性を持つため、光合成変換機構、及びストレス耐性機構を解明するモデル植物としてこれまで様々な研究がなされ、関連遺伝子も多く単離されてきた。特に最近では、ストレス時のシグナル伝達³⁴⁾、抗酸化酵素・物質の挙動³⁹⁾、CAMの制御に関連する時計遺伝子³⁾、¹²⁾、³⁵⁾、アクアポリン¹⁷⁾、及び耕作地に含まれる有害な重金属を除去するファイトレメディエーションに関する研究も進められている¹³⁾。これらの研究で単離された遺伝子はほとんどがアイスプラントに特異的な遺伝子であるとされる⁹⁾。また最近では約25000個の遺伝子の塩基配列が決定されており、ゲノムの全塩基配列を決定する取り組みも開始されつつある¹⁰⁾。他のモデル植物では、遺伝子情報を基に有益な遺伝子を過剰発現させるか、逆に有益な形質の発現を抑える遺伝子を制御した形質転換体の作出が試みられている。またゲノムの全塩基配列が決定された植物では、逆遺伝学的方法を用いた遺伝子の機能解析が盛んに行われている。しかし、アイスプラントでは形質転換法が確立されていないためこのような解析は行われていない。

アイスプラントではこれまで根端細胞²⁾、及びカルス¹⁶⁾に遺伝子を導入した報告はあるが、それらの外植体から植物体を再生した形質転換体は得られていない。アイスプラントにおける培養再生系はいくつか報告はされているが⁵⁾、¹¹⁾、²²⁾、³⁸⁾、いずれも再分化効率が低いため形質転換への利用は困難である。不定芽の誘導にはサイトカイニンの種類や濃度が重要である。最近、アデニン系サイトカイニンでは難しいとされていた木本種の再分化にウレア系サイトカイニンの有効性が示され、いくつかの木本種で再分化法が確立されている¹⁵⁾、²⁰⁾。特にその一つであるチジアズロンの有効性は高く評価され、最近では木本のみならず草本でも用いられるようになった²⁵⁾。アイスプラントの培養再生系には、これまでアデニン系のサイトカイニンやゼアチンを用いた例は報告されているが、ウレア系サイトカイニンの効果はまだ検討されていない。また外植体の種類も再分化の成否に影響するが⁸⁾、²⁷⁾、³⁹⁾、アイスプラントでは異なる外植体の再分化率を比較した報告は少なく²²⁾、不明な点が多い。

本研究では、胚軸と子葉節を外植体に用いてアイスプラントの再分化に及ぼすウレア系サイトカイニン、チジアズロン(TDZ)、及びホルクロロフェニユロン(CPPU)の影響を調査した。また再生した多芽体の生重や大きさを調査することで再生個体の生育に及ぼすこれら植物生長調節物質の影響を明らかにした。

材料及び方法

1. 供試材料

種子は2%次亜塩素酸ナトリウムで6分間殺菌し、3%ショ糖、ビタミン類(100mg/L ミオイノシトール、1mg/L ニコチン酸、及び1mg/L ピリドキシン塩酸塩)及び0.8%寒天を添加し、pHを5.7に調節したMS培地²⁴⁾に播種した。発芽した植物体は、日長16時間、光強度70~80 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、及び室温25℃に調節したグロースチャンパー内で栽培した。

2. 培養方法と再生個体の馴化

播種後5~7日目の本葉展開直前の小植物体から胚軸と子葉節を実体顕微鏡下で切除し、再分化培地に置床した。再分化培地にはオーキシンとサイトカイニン、3%ショ糖、及び0.8%

寒天を含む MS 培地で、胚軸の再分化培地にはオーキシシンとしてナフタレン酢酸(NAA) (0.1 または 1.0mg/L), サイトカイニンとしてカイネチン(KT) (0.5, 5.0, または 10mg/L), ゼアチン(ZT) (0.5, 5.0, または 10mg/L), ベンジルアデニン(BA) (0.2, または 2.0mg/L), ホルクロロフェニユロン(CPPU) (0.5, 5.0, または 10mg/L), あるいはチジアズロン(TDZ) (0.5, 5.0, または 10mg/L)をそれぞれ組み合わせて添加した。子葉節の再分化培地にはオーキシシンとして NAA (0.0, 0.1, または 1.0mg/L), サイトカイニンとして BA, CPPU, あるいは TDZ (0.0, 0.1, 1.0, 2.5, または 5.0mg/L)をそれぞれ組み合わせて MS 培地に添加した。培養は、温度 25°C, 光強度 70~80 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 及び日長 16 時間に調節したグロースチャンバー内で行った。

外植体から再分化し、本葉が 2 枚展開した幼植物体はシャーレから取り出し、滅菌したパーミキュライトを入れた透明なプラスチック箱 (200mm×350mm×100mm) に移植し馴化した。乾燥から保護するためにプラスチック箱をラップで覆い、上述した温度と光条件に調節したグロースチャンバー内に 3 日間置いた。馴化開始後 2 日目からは、ラップに 25cm² 当たり約 1 個の穴を開け、3 日目にはその倍以上の穴を開けて外気に馴化した。その後温室へ移植し、強光をさけるために 1 週間程度寒冷紗で遮光した。根が活着するところに寒冷紗を取り除き 1/2 倍濃度のホーグランド溶液を与えて栽培した。

3. 再生苗条の生長量の測定

植物生長調節物質を添加した培地から再分化した苗条について、外植体置床後 10 日目に多芽体の長径、短径、及び生重を計測した。

結 果

1. 胚軸培養

再分化の誘導には無菌操作の簡便さから胚軸がよく用いられる。そこでまず NAA と 5 種類のサイトカイニン (KT, ZT, BA, CPPU, 及び TDZ) を添加した培地で胚軸を培養し、不定胚形成にとって最適なホルモンの組み合わせを調査した。5 mg/L ZT および 0.1 mg/L NAA を添加した培地ではカルスを形成することなく直接茎葉を分化した外植体が 1 個体あったが、他の処理区からは苗条は分化しなかった (Table 1)。培養 3 日目には全ての培地で胚軸の切断面からカルスが形成された (Fig. 1)。KT または ZT を添加した培地から形成されたカルスは白くやや堅い形状を示した。BA を添加した培地では培養 7 日目までは白いカルスが形成されたが、10 日目以降には赤色のカルスが出現し始めた (Table 1, Fig. 1A)。カルスの増殖率はウレア系サイトカイニンを添加した培地で高く、特に CPPU で高かった。TDZ を添加した培地から得られたカルスは緑色となった (Table 1, Fig. 1B)。培養 1 ヶ月目にはどの処理区からも不定根を形成するカルスが出現した。カルスは NAA の添加した量に比例して増加した (Table 1, Fig. 1A)。このように同じサイトカイニンでもカルスの増殖及び形状に及ぼす影響が異なった。またカルスの増殖にはウレア系サイトカイニンが効果的であること、胚軸から直接苗条を分化させることは困難であること等が明らかとなった。

2. 子葉節外植体からの不定芽再生

子葉節を外植体として培養すると、NAA と BA, CPPU, または TDZ を添加した全ての培地から不定芽が得られた (Table 2)。なおここでは不定芽と側芽を区別するために 2 個体以上の不定芽を形成した外植体を再分化個体として調査した。再分化率は 4.1~85.7% で、添加する

Table 1. Morphogenic response of hypocotyls culture of *M. crystallinum* on MS medium supplemented with the combination of NAA plus KT, ZT, BA, CPPU or TDZ

Cytokinin (mg/L) + NAA (mg/L)	Number of explants	Number of shoot induced per explant	Callus formation of the explants ^{a)}	Callus color ^{b)}
KT(0.5)+NAA(0.1)	36	0	+	W
KT(5.0)+NAA(0.1)	35	0	+	W
KT(10)+NAA(0.1)	41	0	+	W
KT(0.5)+NAA(1.0)	48	0	++	W
KT(5.0)+NAA(1.0)	10	0	++	W
KT(10)+NAA(1.0)	9	0	+++	W
ZT(0.5)+NAA(0.1)	38	0	+	W
ZT(5.0)+NAA(0.1)	40	0	+	W
ZT(10)+NAA(0.1)	40	0	+	W
ZT(0.5)+NAA(1.0)	40	0	++	W
ZT(5.0)+NAA(1.0)	87	1	++	W
ZT(10)+NAA(1.0)	46	0	++	W
BA(0.2)+NAA(0.1)	55	0	+	W or R
BA(2.0)+NAA(0.1)	35	0	+	W or R
BA(0.2)+NAA(1.0)	57	0	++	W or R
BA(2.0)+NAA(1.0)	81	0	+++	W or R
CPPU(0.5)+NAA(0.1)	50	0	+++	W or Y
CPPU(5.0)+NAA(0.1)	50	0	+++	W or Y
CPPU(10)+NAA(0.1)	50	0	+++	W or Y
CPPU(0.5)+NAA(1.0)	50	0	++++	W or Y
CPPU(5.0)+NAA(1.0)	50	0	++++	W or Y
CPPU(10)+NAA(1.0)	50	0	++++	W or Y
TDZ(0.5)+NAA(0.1)	50	0	++	G
TDZ(5.0)+NAA(0.1)	50	0	++	G
TDZ(10)+NAA(0.1)	50	0	++	G
TDZ(0.5)+NAA(1.0)	50	0	+++	G
TDZ(5.0)+NAA(1.0)	50	0	+++	G
TDZ(10)+NAA(1.0)	50	0	+++	G

^{a)} Level of callus production: +, a little callus on the edges; ++, moderate callus; +++, developed callus; +++++, well developed callus

^{b)} Callus color: W, white; Y, yellow; R, red; G, green

サイトカイニンの種類及び濃度によって大きく変化した (Table2). BA を添加した培地では、再分化率は平均64.7%であった。NAA の添加量が増加するに伴い徐々に再分化率は低下した (Table2)。CPPU を添加した培地における再分化率は平均36.1%であり、用いたサイトカイニンの中では最も低かった。さらに添加する NAA 量が増加すると再分化率が低下し、特に1.0 mg/l 添加した培地の再分化率は低く (平均7.5%)、3 個体以上の苗条が分化した多芽体は得られなかった (Table2, Fig.2)。再分化率は TDZ を単独で培地に添加した区で最も高く、平均して80.3%、最高は2.5mg/L TDZ を添加した区で85.7%であった。これは処理区中最も高い再分化率であった。苗条が2 個体のみ分化した多芽体は BA 及び CPPU を添加した培地で多い傾向にあったが、CPPU と NAA を合わせて添加した区では多芽体形成率が大きく低下し、NAA を 1 mg/L 添加した培地では3 個体以上の苗条は得られなかった。TDZ を添加した培地では多芽体形成率及び苗条分化数が他のサイトカイニンを添加した培地より多かった。BA および

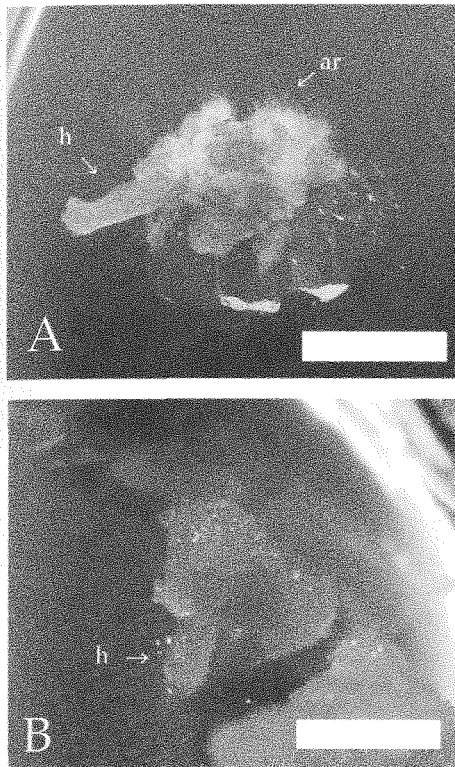


Fig.1 Effect of different cytokinins on callus formation derived from 7-day-old hypocotyl of *Mesembryanthemum crystallinum*

A: Red callus derived from MS medium including 1.0 mg/L BA and 1.0 mg/L NAA. B: Green callus derived from MS medium including 1.0 mg/L and 0.1 mg/L NAA. h: hypocotyl, ar: adventitious roots, bars: 5 mm.

CPPU を含んだ培地では 4 個体以上の苗条は得られなかったのに対し、0.5mg/L, 1.0mg/L, または 2.5mg/L TDZ を含んだ培地と 5.0mg/L TDZ 及び 0.1mg/L NAA を含んだ培地では供試した全外植体の 40% 以上が 4 個体以上の苗条を形成した。また培地に添加した NAA 濃度が高くなると苗条形成率が減少し (Fig. 2), ガラス化した個体も増加する傾向がみられた (データ省略)。ガラス化は CPPU を添加した培地で最も多く, TDZ を添加した培地で最も少なかった。以上のことから苗条分化率及び苗条の誘導に対しては TDZ が最も効果的であると考えられた。

3. 再分化した苗条の生重, 長径, 及び短径

子葉節から再生した苗条を含む外植体の生重を Fig. 3 に示した。苗条数が増加するに伴い, 全ての処理区で生重は低下した (Fig. 3)。2 個体, 3 個体, 及び 4 個体以上の苗条が分化した多芽体の生重の最大値は, BA を添加した培地でそれぞれ 0.27 g, 0.23 g, 及び 0.17 g, CPPU を添加した培地では, 0.21 g, 0.15 g, 及び 0.17 g, TDZ を添加した培地では, 0.19 g, 0.16 g, 及び 0.16 g であった。BA は 1.0mg/L, CPPU は 1.0mg/L, 及び 2.5mg/L が生重の増加にとって最適な濃度であった。BA を添加した培地では, 生重に及ぼす NAA の影響は小さかったが (Fig. 3)。CPPU 及び TDZ を添加した培地では, NAA を含まない培地

から再生した多芽体の生重が最も重く, NAA を添加すると生重が低下する傾向がみられた。この傾向は CPPU で著しかった (Fig. 3)。

Fig. 4 には多芽体の長径及び短径を示した。多芽体の長径及び短径ともに, サイトカイニンと NAA の組み合わせの種類や濃度によって有意な差異は認められなかった。しかし BA 及び CPPU を含む培地に 1.0mg/L NAA を合わせて添加した培地で長径及び短径が長くなる傾向があった (Fig. 4)。これらの培地から得られた多芽体はガラス化した苗条が多かった。TDZ を含んだ培地では TDZ を単独で添加すると, 長径及び短径がともに大きな多芽体を得られた。しかし TDZ を含んだ培地に 1.0mg/L NAA を添加すると, 多芽体が小型化し, やや歪な形をした苗条が得られた (データ省略)。

考 察

アイスプラントでは形質転換体の作出法が確立されていないため, 本研究ではパーティクルガンやアグロバクテリウムを用いた形質転換法の基礎となる *in vitro* での高効率な再分化法の確立を試みた。再分化にはカルスから不定胚を誘導する場合と外植体から直接苗条を形成す

Table 2. Cultured cotyledonary node of *M. crystallinum* and frequencies of explants with adventitious shoots formed directly on initial cultural media^{a)}

Cytokinin (mg/L) + NAA (mg/L)	Number of adventitious shoots	Frequency of explants with adventitious shoot formation (%)	Total number of explants cultured
BA(0.0)+NAA(0.0)	0	0.0	115
BA(0.5)+NAA(0.0)	83	72.7	44
BA(1.0)+NAA(0.0)	136	79.2	48
BA(2.5)+NAA(0.0)	170	75.4	57
BA(5.0)+NAA(0.0)	109	70.5	44
BA(0.0)+NAA(0.1)	0	0.0	43
BA(0.5)+NAA(0.1)	246	75.0	116
BA(1.0)+NAA(0.1)	208	70.0	100
BA(2.5)+NAA(0.1)	196	65.7	99
BA(5.0)+NAA(0.1)	279	55.0	111
BA(0.0)+NAA(1.0)	0	0.0	45
BA(0.5)+NAA(1.0)	71	55.8	52
BA(1.0)+NAA(1.0)	81	64.0	50
BA(2.5)+NAA(1.0)	88	65.3	49
BA(5.0)+NAA(1.0)	54	28.2	71
CPPU(0.5)+NAA(0.0)	20	23.7	38
CPPU(1.0)+NAA(0.0)	70	66.7	48
CPPU(2.5)+NAA(0.0)	112	76.0	50
CPPU(5.0)+NAA(0.0)	144	78.0	50
CPPU(0.5)+NAA(0.1)	4	6.1	33
CPPU(1.0)+NAA(0.1)	38	36.0	50
CPPU(2.5)+NAA(0.1)	84	65.4	52
CPPU(5.0)+NAA(0.1)	44	52.8	36
CPPU(0.5)+NAA(1.0)	6	5.9	51
CPPU(0.5)+NAA(1.0)	8	7.7	52
CPPU(0.5)+NAA(1.0)	4	4.1	49
CPPU(0.5)+NAA(1.0)	12	12.5	48
TDZ(0.5)+NAA(0.0)	142	82.4	34
TDZ(1.0)+NAA(0.0)	149	74.1	54
TDZ(2.5)+NAA(0.0)	314	85.7	49
TDZ(5.0)+NAA(0.0)	128	79.2	48
TDZ(0.5)+NAA(0.1)	85	62.2	45
TDZ(1.0)+NAA(0.1)	110	79.5	44
TDZ(2.5)+NAA(0.1)	91	66.7	45
TDZ(5.0)+NAA(0.1)	167	75.0	44
TDZ(0.5)+NAA(1.0)	10	26.3	19
TDZ(1.0)+NAA(1.0)	24	37.0	27
TDZ(2.5)+NAA(1.0)	18	29.6	27
TDZ(5.0)+NAA(1.0)	28	27.1	48

^{a)} Initial cultural medium: MS salts, vitamins, 3% sucrose, and 0.8% agar

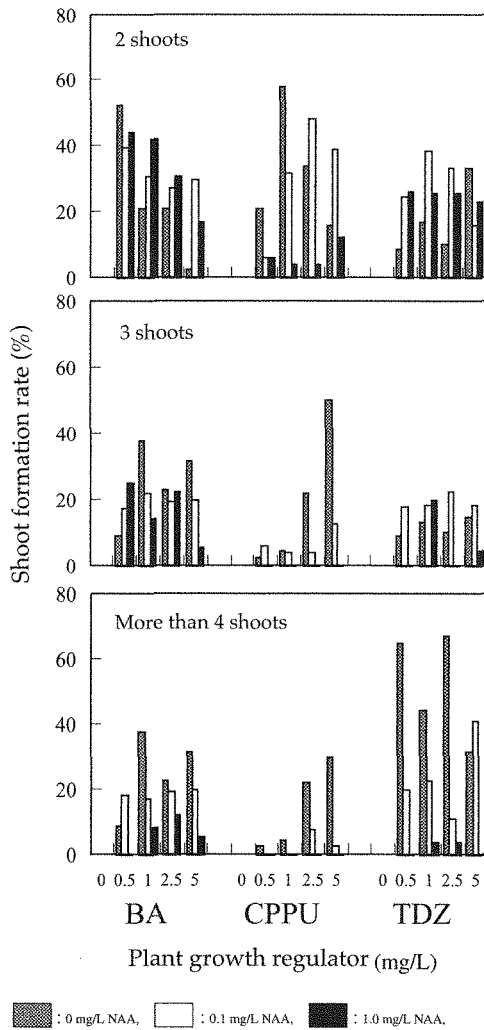


Fig.2 Effect of the combination of NAA plus BA, CPPU, or TDZ on the number of shoot formation in *M. crystallinum*.

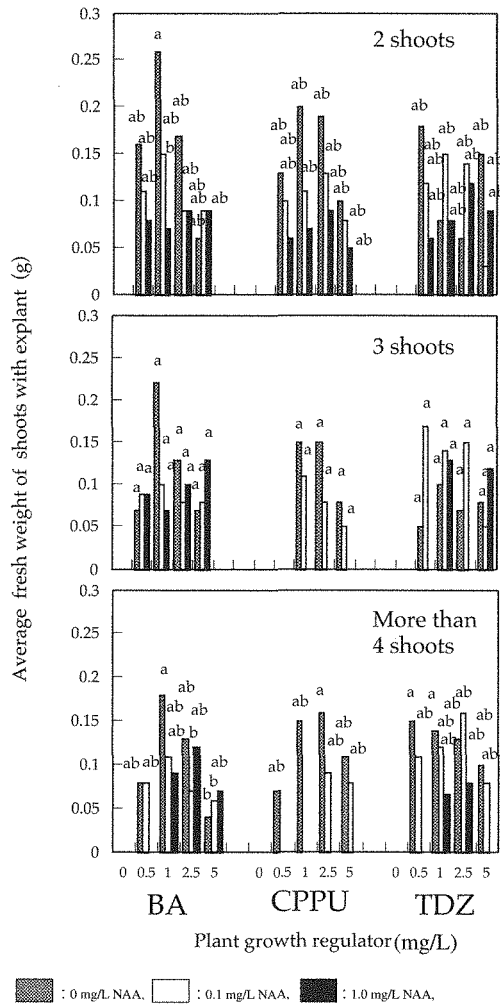


Fig.3 Effect of the combination of NAA plus BA, CPPU or TDZ on fresh weight of shoot with explant of *M. crystallinum*. Bars having different letters are significantly different at the 5% level (Kruskal-Wallis one way ANOVA on ranks and Scheffe test procedure).

る2通りの方法がある。カルスを長期間培養すると体細胞変異が起こりやすいことは以前から知られており¹⁸⁾、アグロバクテリウムを介してカルスから得た形質転換体に体細胞変異がみられることが報告されている^{4),7)}。したがって変異の少ないアイスプラントの形質転換体を得るには、外植体から直接苗条を分化させることが望ましいと考えられ、本法でも外植体から直接苗条を得る再分化法を確立することにした。

遺伝的要因と同様、外植体の種類も不定芽分化に影響を与える要因として重要である^{30),33)}。これまで、幼葉、茎頂、幼穂、未熟胚、完熟胚、種子、根、胚軸、子葉、莖、または成熟葉など、様々な組織や器官が外植体として用いられている。一般に胚軸は分化能が高く無菌操作が容易であることから、いくつかの双子葉植物においてカルスを誘導する培養再生系の外植体としてよく用いられる⁵⁾。アイスプラントにおいても胚軸を外植体として使用した例が多く、カ

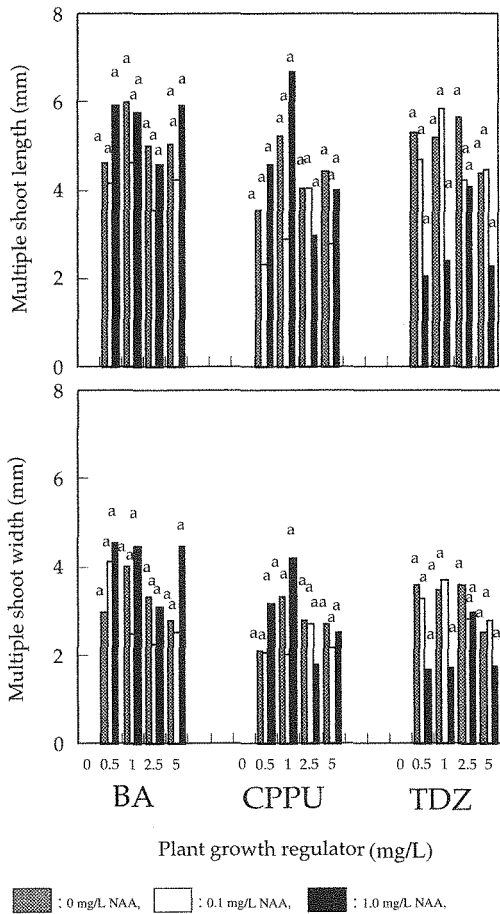


Fig.4 Effect of the combination of NAA plus BA, CPPU, or TDZ on multiple shoot length and width of *M. crystallinum*. Bars having different letters are significantly at the 5% level (Kruskal-Wallis one way ANOVA on ranks and Scheffe test procedure).

ことに成功している⁶⁾。そこで本研究では未分化の茎頂分裂組織を含む本葉展開直前の子葉節を外植体として用いたが、播種後5~7日後の本葉展開直前のアイスプラントの子葉節を培養すると、多芽体を直接誘導できることが明らかになった。子葉節以外の外植体も併せて調査したが、再分化しなかった(データ省略)。他の植物、例えばアスターのように、葉切片からの不定芽形成率はほぼ100%であるのに対して、子葉や胚軸ではホルモンの種類や濃度を変化させても不定芽はほとんど形成されない種もある³²⁾。また同じアカザ科である *Mesembryanthemum floribundum* の場合、胚軸からは不定胚は得られないが、葉切片を IAA 存在下で培養すると不定胚が誘導される²¹⁾。これらのようにアイスプラントも外植体の種類によって再分化効率が著しく異なると考えられる。前述したように、形質転換には外植体から直接苗条を分化させることが望ましいことから、アイスプラントの再分化には本葉展開直前の子葉節が最も適していると考えられる。

次にサイトカイニンの種類について考察する。一般に、サイトカイニン活性はアデニン系よ

ルスを經由した不定胚または不定芽形成が試みられている^{1), 11), 38)}。しかし Cushman et al.¹¹⁾ が示しているように、アイスプラントの外植体から embryogenic なカルスが得られる頻度は0.5~1.0%と極端に低い。Wang and Lutge³⁸⁾ もカルスから不定胚を誘導し植物体の再分化に成功したとしているが、それには不定胚形成率および再分化率は示されておらず頻度は不明である。Meiners et al.²²⁾ は胚軸から比較的高い割合(23~34%)で苗条を得ているが、Table1で示したように、胚軸の再分化率は著しく低く、本研究で苗条が分化した個体は1299個体中わずか1個体であった。またいったんカルスに脱分化するとそれから再分化する個体は得られなかった。カルスの場合は6ヶ月間培養したが、細胞の増殖と不定根の発生以外は形態的な変化はみられなかった (Fig. 1)。Meiners et al.²²⁾ の報告では外植体の取得方法は記述されておらず、我々が行ったように胚軸を実体顕微鏡下で切除したのかは不明である。彼らの報告で胚軸からの苗条分化率が高かったのは、切除した胚軸に子葉節部分が含まれていた可能性が考えられる。

一般に未分化または未熟な組織は、成熟した組織より形態形成能が高いため^{19), 36)}、カルスからの再分化が難しい植物種の外植体として完熟種子の子葉節が用いられる場合がある。例えば、マメ科植物は再分化率が低く、特にカルスからはほとんど再分化しないが、最近になって子葉節を用いて再分化個体を得ること

りウレア系の方が高いとされている^{26),31)}。本研究においても苗条の分化にはウレア系のチジアズロンが最も効果的であった (Fig. 2)。CPPU はウレア系サイトカイニンであるが TDZ のような苗条分化に対する効果は低く、BA よりも効率が低いことが明らかとなった。CPPU は種によって KT または BA よりサイトカイニン活性が強いという報告があるが²³⁾、アイスプラントでは BA より弱いあるいは同程度の効果を有すると考えられる。

再分化はサイトカイニンとオーキシンのバランスによって引き起こされるが²⁸⁾、本研究では、NAA を培地に添加すると、再生苗条数の減少、及び多芽体の小型化が誘導される傾向がみられ、これは BA を含んでいる培地よりも CPPU または TDZ を含んでいる培地で顕著であった。TDZ を添加した培地では苗条形成率はオーキシンを添加せず、TDZ を単独で添加した培地で最も高かった。TDZ はサイトカイニン様活性のみならずオーキシン様活性を持つことが報告されている³⁷⁾。またメロンの子房に CPPU を塗布すると、塗布部分の内生オーキシンであるインドール酢酸 (IAA) が著しく増加することが報告されている¹⁴⁾。このようにウレア系サイトカイニンはオーキシン様活性を合わせ持つかあるいは内生オーキシン量を増加させることから、アイスプラントの再分化にウレア系サイトカイニンを用いる場合、オーキシンを添加しない方がホルモンバランスは良いと考えられる。

本研究の結果からアイスプラントの再分化にはアデニン系サイトカイニンよりもウレア系サイトカイニンが有効であること、また特に苗条形成には TDZ が効果的で、その最適含量は 2.5 mg/L であることが明らかとなった。またこの再分化法はカルスを経由せずに直接苗条を誘導するため、培養期間を短縮でき、体細胞変異を起こしにくいと考えられる。以上のことから本法はこれまでの方法と比較して最も簡便かつ効率적であると考えられる。本再分化法はアイスプラントの形質転換体を作成する際の有効な培養再生系になりうると考えられた。

摘 要

アイスプラントは環境刺激による光合成変換機構、及びストレス耐性機構を調べるモデル植物として多くの研究に用いられてきた。しかし、培養細胞や外植体からの再分化が困難なため、形質転換体を用いた研究は行われていない。本研究では、アイスプラントの効率の良い再分化法を確立するため、サイトカイニン活性の高いウレア系サイトカイニンであるチジアズロン (TDZ)、及びホルクロロフェニユロン (CPPU) を胚軸及び子葉節外植体に処理し、再分化効率や再分化個体の形状等を調査した。胚軸は外植体として培養するとカルスは誘導されたが、苗条の分化はほとんどみられなかった。一方、子葉節を外植体として培養するといずれの処理区においても苗条が分化した。不定芽は TDZ を含む培地で最も多く得られた。特に多芽体形成数は TDZ を 2.5mg/L 含む培地で最大となった。また苗条のガラス化は TDZ を含む培地で最も少なかった。多芽体の長径、短径、及び生重で評価した生重量には処理時間の違いは認められなかったが、いずれのサイトカイニン処理区においても NAA を添加しない培地で苗条分化率、及び生重が高くなる傾向がみられた。茎葉を十分に発達させた後、生長調節物質を含まない培地で継代培養して発根を誘導し、パーミキュライト、あるいはフロリアライトを含むポットに移植して馴化させた。この手順で培養すると播種から約 4 ヶ月で結実した。本法の適用によりアイスプラントの効率的な形質転換法の確立が可能になると考えられる。

引用文献

1. Abou-Mandour, A.A. (1992). Der einfluß von phytohormonen an die organbildung von gewebeulturen ans *Mesembryanthemum crystallinum* L. und *Mesembryanthemum nodiflorum* L. *Angew. Bot.* 66, 187-191.
2. Androffatto, P., A. Bornhouser, H.J. Bohnert and J.C. Thomas (1994). Transformed hairy roots of *Mesembryanthemum crystallinum*: gene expression patterns upon salt stress. *Physiol. Plant.* 90, 708-714.
3. Boxall, S.F., J.M. Foster, H.J. Bohnert, J.C. Cushman, H.G. Nimmo and J. Hartwell (2005). Conservation and divergence of circadian clock operation in a stress-inducible Crassacean acid metabolism species reveals clock compensation against stress. *Plant Physiol.* 137, 969-982.
4. Bregitzer, P. and D. Tonks (2003). Inheritance and expression of transgenes in barley. *Crop Sci.* 43, 4-12.
5. Brown, D.C.W., K.I. Finstad, and E.M. Watson (1995). Somatic embryogenesis in herbaceous dicots. *In vitro embryogenesis in plants.* ed. Thorpe T.A. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. p 345-415.
6. Chandra, A., and D. Pental. (2003). Regeneration and genetic transformation of grain legumes: An overview. *Curr. Sci.* 84(3), 381-387.
7. Choi, H.W., P.G. Lemaux and M.-J. Cho (2000). Increased chromosomal variation in transgenic versus nontransgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) plants. *Crop Sci.* 40, 524-533
8. Chee, P.P. (1990). High frequency of somatic embryogenesis and recovery of fertile cucumber plants. *Hort. Sci.* 25, 792-793.
9. Cushman, J.C. and H.J. Bohnert (2000). Genomic approaches to plant stress tolerance. *Curr. Opinion Plant Biol.* 3, 117-124.
10. Cushman, J.C. and H.J. Bohnert (2002). Induction of Crassulacean acid metabolism by salinity molecular aspects. *Salinity: Environment-Plants-Molecules.* ed. Läuchli A. and U. Lüttge. Kluwer Academic. Publishers. Dordrecht. p 361-393.
11. Cushman, J.C., T. Wulan, N. Kuscuoğlu and M.D. Spatz (2000). Efficient plant regeneration of *Mesembryanthemum crystallinum* via somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 19, 459-463.
12. Dodd, A.N., H. Griffiths, T. Taybi, J.C. Cushman and A.M. Borland (2003). Integrating dual starch metabolism with the circadian and environmental regulation of Crassulacean acid metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Planta* 216, 789-797.
13. Ghuna, T., I. Nouairi, I. Slama, D. Messebi, C. Grignon, C. Abdey and M.H. Ghorbel (2005). Cadmium effects on growth and mineral nutrition of two halophytes: *Sesuvium portulacastrum* and *Mesembryanthemum crystallinum*. *J. Plant Physiol.* in press.
14. Hayata, Y., X.-X. Li and Y. Osajima (2002). Pollination and CPPU treatment increase endogenous IAA and decrease endogenous ABA in Muskmelons during early development. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 127(6), 908-911.
15. Huetteman, C.A. and J.E. Preece (1993). Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 33, 105-119.
16. Ishimaru, K. (1999). Transformation of a CAM plant, facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 57, 61-63.
17. Kirch, H.-H., R. Vera-Estrella, D. Gollidack, F. Quigley, C.B. Michalowski, B.J. Barkra, and H.J. Bohnert. (2000). Expression of water channel proteins in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol.* 123, 111-124.
18. Larkin, P.J. and W.R. Scowcroft (1981). Somaclonal variation—a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60, 197-214.
19. Lörz, H., E. Göbel and P. Brown (1988). Advances in tissue culture and progress towards genetic transformation of cereals. *Plant Breeding* 100, 1-25.
20. Lu, M.-G., I. Ogiwara, N. Hakoda, and I. Shimamura (1994). Effects of BA, TDZ and CPPU on formation of adventitious shoots from callus derived from apple cotyledon. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 63, 505-514.
21. Mehra, A. and P.N. Mehra (1972). Differentiation in callus cultures of *Mesembryanthemum floribundum*. *Phytomorphology* 22, 171-176.
22. Meiners, M.S., J.C. Thomas, H.J. Bohnert and J.C. Cushman (1991). Regeneration of multiple shoots and plants from

- Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Cell Rep.* 9, 563-566
23. Millan-Mendoza, B. and J. Graham (1999). Organogenesis and micropropagation in red raspberry using forchlorfenuron (CPPU). *J. Hort. Sci. Biotech.* 74, 219-223.
 24. Murashige, T. and F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay in tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15, 473-493.
 25. Murthy, B.N.S., S.J. Murch and P.K. Saxena (1998). Thidiazuron: a potent regulator of in vitro plant morphogenesis. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 34, 267-275.
 26. Okamoto, T., K. Shudo, S. Takahashi, E. Kawachi and Y. Isogai (1981). 4-Pyridylureas are surprisingly potent cytokinins. The structure-activity relationship. *Chem. Pharm. Bull.* 29, 3748-3750.
 27. Punja, Z.K., N. Abbas, G.G. Sarmiento and F.A. Tang (1990). Regeneration of *Cucumis sativus* var. *sativus* and *C. sativus* var. *hardwickii*, *C. melo* and *C. metuliferus* from explants through somatic embryogenesis and organogenesis: Influence of explant source, genotype and growth regulators. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 21, 93-102.
 28. Skoog, F. and C.O. Miller (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11, 118-130.
 29. Śleak, I., Z. Miszałski, B. Karpinska, E. Niewiadomska, R. Ratajczak and S. Karpinski (2002). Redox control of oxidative stress responses in the C₃-CAM intermediate plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol. Biochem.* 40, 669-677.
 30. Szabados, L., R. Hoyos and W. Roca (1987). In vitro somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava. *Plant Cell Rep.* 6, 248-251.
 31. Takahashi, S., T. Shudo, T. Okamoto, K. Yamada, and Y. Isogai (1978). Cytokinin activity of *N*-phenyl-*N'*-(4-pyridyl) urea derivatives. *Phytochem.* 17, 1201-1207.
 32. 谷本静史 (1984). 外植片の生理的状态と不定器官分化能. 植物組織培養 1 (1)28-29.
 33. Trolinder, N.L. and C. Xhixian (1989). Genotype specificity of the somatic embryogenesis response in cotton. *Plant Cell Rep.* 8, 133-136.
 34. Taybi, T. and J.C. Cushman (2002). Abscisic acid signaling and protein synthesis requirements for CAM induction in the common ice plant. *J. Plant Physiol.* 159, 1235-1243.
 35. Taybi, T. and J.C. Cushman (2000). A minimal serine/threonine protein kinase circadianly regulates phosphoenolpyruvate carboxylase activity in crassulacean acid metabolism-induced leaves of the common ice plant. *Plant Physiol.* 123, 1471-1481.
 36. Vasil, I.K. and V. Vasil (1986). Regeneration in cereal and other grass species. In: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Volume 3, Plant Regeneration and Genetic Variability*. ed. Vasil, I.K. Academic Press. Orlando. p 121-150.
 37. Visser, C., J.A. Qureshi, R. Gill and P.K. Saxena (1992). Morphoregulatory role of thidiazuron. *Plant Physiol.* 99, 1704-1707.
 38. Wang, B. and U. Lüttge (1994). Induction and subculture of callus and regeneration of fertile plants of *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Polish J. Environ. Stu.* 3(4), 55-57.
 39. Williams, E.G. and G. Maheswaran (1986). Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Ann. Bot.* 57, 443-462.