

ペパーミントのプロトプラスト培養における 4-PU の効果

佐藤 洋*・榎本末男**・岡 成美***・細見和雄*・伊東禎男*

*(株)ロッテ中央研究所

(〒336 埼玉県浦和市沼影 3-1-1)

**野菜・茶業試験場

(〒514-23 三重県安芸郡安濃町草生)

***農林水産省農業生物資源研究所

(〒305 茨城県つくば市観音台 2-1-2)

(1993 年 12 月 5 日受付)

(1994 年 2 月 26 日受理)

ペパーミント無菌植物体本葉より単離されたプロトプラストを既報手法により直径 2 mm 程度に育成し、これを NAA 0.1 mg/l とサイトカイニン類として複数の濃度の BA または 4-PU を含む再分化培地に移植し、莖葉再分化率を調査した。その結果、既報の NAA 0.1 mg/l, BA 1-5 mg/l を添加した場合の再分化率に比べ、4-PU を用いた場合、明らかに莖葉の再生率が上昇した。

1. 緒 言

ミントはシソ科の多年草であり、その全草より得られる精油は、古くから香料または薬用として利用されてきた。現在においてもチューインガムやキャンディーなどの菓子食品を始め、歯磨やシャンプーなど用途は広く¹⁾、我々にとって最も重要な香料植物の一つである。

ミントには世界中に数多くの種、または変種が存在するが、中でも「西洋ハッカ」または「ミッチャムミント」とも称されるペパーミント (*Mentha piperita* L.) は、その良質な香味ゆえミントの代名詞的品種である。一般にミントは容易に種間雑種を形成するが^{2,3)}、これらの雑種は高度の不稔性を示す⁴⁾。ペパーミントもそうした天然種間雑種の 3 倍体であると考えられており、不稔であるため通常の交配育種は行えない。従って、本植物種の育種は、放射線育種^{5,6)}や、倍数体を育成した上での交配⁷⁾に限られていた。

近年、細胞融合法や、遺伝子導入法が植物の新しい育種法として盛んに試みられているが⁸⁻¹²⁾、著者らもこれらの手法がペパーミントの育種に有効ではないかと注目し、本植物の組織培養法について種々検討してきた結果、その第 1 段階であるプロトプラスト培養による植物体

再生に成功した^{13,14)}。しかしながら、この手法は本葉より単離したプロトプラストを効率良くカルスにまでは育成できるが、そのカルスからの莖葉再生率が 8% 前後と低い値であり、改善が求められていた。既報の培養系では成長調節剤として終始 NAA-BA 系を用いてきたが、今回莖葉再生段階で用いるサイトカイニン類について検討したところ、4-PU (*N*-phenyl-*N'*-4-pyridyl urea)¹⁵⁾ が有効であることが分かった。また、培養方法についても若干の改良を加えることでカルスからの莖葉再生率を大幅に上昇させることに成功したので、それらについて以下に報告する。

2. 材料および方法

(1) 無菌植物体の育成

実験には、最も一般的なペパーミントの栽培品種である「ブラックミント」 (*Mentha piperita* L. cv. Black mint) を供試した。ガラスケース中で育成した植物体の腋芽を滅菌蒸留水にてよく洗浄した後、70% エタノールに約 1 分間浸した。続いて、有効塩素濃度 1% の次亜塩素酸ナトリウム溶液にて攪拌しながら 15 分間表面殺菌を行った。これを滅菌蒸留水にて 3 回洗った後、40×130 mm の培養器中に作成した Gamborg の B5 培

地¹⁶⁾(agar 0.8%, sucrose 2%, pH 6.0)に挿し、25°C、3,000 lux、16時間照明下で培養し、シュートの伸長を促した。伸長したシュートは、その茎頂部を切り取って新しい培地に挿し、グロースチャンバーにて25°C、8,000 lux、16時間照明下で育成した。このシュートは約1ヶ月毎に茎頂部を継代移植した。尚、培養器の蓋には、通気性と光の透過性を良くするため、「ミリシール」(Millipore)を貼った「ダイアホイル」(ダイアホイル株)を用いた。

(2) プロトプラストの単離・精製

茎頂部を移植後、30日前後育成したシュートから、その第2節より第4節までの本葉を新鮮重で約0.8g集めた。これを1-2mm幅にスライスしてCPW塩溶液¹⁷⁾(0.5 M mannitol)に約4時間浸した後、濾過滅菌したプロトプラスト単離酵素液20 ml(Macerozyme R-10 0.8%, Cellulase YC 2%, 0.5 M mannitol, pH 5.8)に移し25°C、暗黒下で一夜静置した。続いて、70 rpmで約30分静かに振とうした後、「ミラクロス」(Hoechst Co. Ltd)で濾過して未消化の組織を除いた。濾液は10 ml容のガラス遠沈管に移し、100×g 2分間の遠心分離によってプロトプラストを沈殿させ、1.5 mlのCPW塩溶液に再懸濁した後、10%の“Ficoll 400”(Pharmacia-LKB Biotech. AB)(0.5 M mannitol)溶液6 mlに重層し、100×g 10分間遠心分離を行った。“Ficoll”層とCPW塩溶液との境界に形成されたプロトプラスト層をパスツールピペットにて取り、6 mlのCPW塩溶液による洗浄を3回繰り返してプロトプラストを精製した。

(3) プロトプラストの培養

単離・精製後のプロトプラストは、既報の初期培養用培地(Table 1)に 1.0×10^5 cells/mlで懸濁し、その1.5 mlを60×15 mmの滅菌プラスチックシャーレ中で1.5 mlのGelrite(SCOTT LABORATORIES, INC.)溶液(Gelrite 0.2%, 0.5 M mannitol, 1% sucrose)と混合した。この操作によりプロトプラストは培養密度 5.0×10^4 cells/mlで1/2に希釈された初期培養培地(Gelrite 0.1%, sucrose 1%)に包埋された。

初期培養培地に包埋されたプロトプラストは、25°C、暗黒下で培養した。初期培養培地で直径約0.3 mmに成長したコロニーは、初期培養培地に包埋したまま6等分に切り出し、初期培養培地と同組成の液体培地30 mlに移植した。これを、70 rpmで振とうしながら培養する(以下「ビーズ培養」とする)ことによりさらに成長を促した。また、一部は、ビーズ培養の期間中、1週間毎に培地をmannitolを含まない培地と交換することにより、浸透圧を最終的にmannitol 0.2 Mにまで低下さ

Table 1. Medium for peppermint protoplast culture.

components	mg/l
KNO ₃	1,250
(NH ₄) ₂ SO ₄	67
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	85
MgSO ₄ ·7H ₂ O	500
CaCl ₂ ·2H ₂ O	300
MnSO ₄ ·4H ₂ O	20
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	4
H ₃ BO ₃	6
KI	1.5
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.5
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.05
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.05
FeSO ₄ ·7H ₂ O	55.6
Na ₂ -EDTA	75
myo-inositol	200
Nicotinic acid	2
Pyridoxine HCl	2
Thiamine HCl	20
Sucrose	10,000
Mannitol	91,100
NAA	2
BA	0.8
pH	6.0

Protoplast suspension in this medium was combined and solidified with equal volume of Gelrite solution containing 1% sucrose, 0.5M mannitol and 0.2% Gelrite.

せつつ育成した(以下浸透圧低下区)。

直径約0.5 mmに成長したカルスは、ビーズ培養時に用いた液体培地と同組成の培地を0.2%のGelriteで固めた平板培地(緑化カルス誘導培地)に展開し、照明下で約3週間培養することにより緑化カルスを育成した。尚、ビーズ培養時に浸透圧低下区の場合は緑化カルス誘導培地のmannitol濃度を0.2 Mに減じた。

(4) 茎葉の再生

緑化カルス誘導培地上で直径約1.5-2.0 mmに成長した緑化カルスは、B5培地を基本に、sucrose 2%, NAA 0.1 mg/l, Gelrite 0.2%, mannitol 0.2 M(浸透圧低下区は0 M)にBA 0.5-5 mg/lまたは4-PU 0.25-5 mg/lを添加した再分化誘導培地に移植した。尚、シャーレ(90×20 mm)で作成した平板培地(培地30 ml当たりカルス21-25個を置床)と、25 mm径の試験管で作成

Table 2. Effect of cytokinins and reduction of osmoticum on shoot formation from protoplast-derived callus of *Mentha piperita*.

Cytokinins(mg/l)		reduction of osmoticum* ¹	vessel and inoculum density* ²	No. of tested callus	No. of regenerated callus	Frequency of shoot formation(%) * ³
BA	4-PU					
0.5	—	+	P	63	0	0
		+	T	50	3	6.0c
		—	P	250	0	0
1.0	—	—	T	50	2	4.0c
		+	P	63	5	7.9c
		+	T	50	4	8.0c
		—	P	250	17	6.8c
5.0	—	—	T	50	4	8.0c
		+	P	63	5	7.9c
		+	T	50	3	6.0c
		—	P	250	22	8.8c
—	0.25	—	T	50	4	8.0c
		+	P	105	7	6.7c
		+	T	100	19	19.0b
		—	P	105	6	5.7c
—	0.5	—	T	100	9	9.0c
		+	P	105	18	17.1b
		+	T	100	67	67.0a
		—	P	105	15	14.3bc
—	1.0	—	T	100	33	33.0b
		+	P	105	7	6.7c
		+	T	100	22	22.0b
		—	P	105	8	7.6c
—	5.0	—	T	100	15	15.0b
		+	P	105	6	5.7c
		+	T	100	5	5.0c
		—	P	105	7	6.7c
		—	T	100	3	3.0c

Basal medium; B5, sucrose 2%, NAA 0.1 mg/l, Gelrite 0.2%
Green calli about 2 mm diameter were transferred to each medium and cultured for 6-8 weeks at 25°C in the light.
*¹+ = Final mannitol concentration was reduced to 0 M.
— = Final mannitol concentration was reduced to 0.2M.
*²P=Plate medium (90 mm diameter). 21-25 calli were transferred on each plate.
T=Slant medium in 25 mm test tube. A green callus was transferred into each medium.
*³In this column, numbers having the same letter are not significantly different at 5% level based on χ^2 value.

したスラント培地(培地 10 ml 当たりカルスを 1 個ずつ置床)の 2 種類の再分化培地で再分化率の違いを調査した。

3. 結果および考察

(1) プロトプラストの単離・培養

前述の方法により、新鮮重 0.8 g のペパーミント本葉から 7.1×10^6 cells/ml のプロトプラストが単離された。また FDA 染色法¹⁸⁾による生存活性は約 80% であった。

初期培養培地に包埋されたプロトプラストは、培養開始後 5~6 日にかけて分裂を開始し、培養開始後約 30

日には、直径約 0.3 mm の小カルスに成長した。これらをカルス育成培地にてビーズ培養することにより、小カルスは約 30 日後には直径約 0.5 mm に成長した。浸透圧低下区では、小カルスの成長は対照区と比べやや早かったが、小カルスの黒変性が激しく、培地の交換を慎重に行わないと枯死してしまう傾向にあった。そこで、培地の交換は 2 週間毎に 5 ml ずつ 4 回行うことで最終的に mannitol 濃度を 0.2 M に低下させた。

ビーズ培養後のカルスは、緑化カルス誘導培地に展開し、3,000 lux, 16 時間照明下で約 3 週間培養したとこ

ろ、直径約 1.5–2 mm の緑化カルスが誘導された。

(2) 茎葉の再生

Table 2 に示される通り、サイトカイニンとして 4-PU を 0.5 mg/l で用いた場合、BA の場合と比べ明らかに茎葉の再生率が上昇した。組織培養における 4-PU または、その誘導体の効果については、シソ (*Perilla frutescens*) リーフディスクからの茎葉再生に関して、4-PU の誘導体である *N*-Phenyl-*N'*-2-Cl-4PU が効果的であったとする報告が Tanimoto ら¹⁹⁾によりなされており、シソ科植物の茎葉再生については BA, ZEA, KIN といった核酸誘導体のサイトカイニンよりも 4-PU を始めとするジフェニル尿素系サイトカイニンの有効性が示唆される。

BA が添加された再分化培地上では、カルスは、濃緑色で、硬質な形状を呈したのに対し、4-PU が添加された培地に置床されたカルスは、淡緑色でやや軟質なドーム状となり、その表面または内部に茎葉の原基と考えら

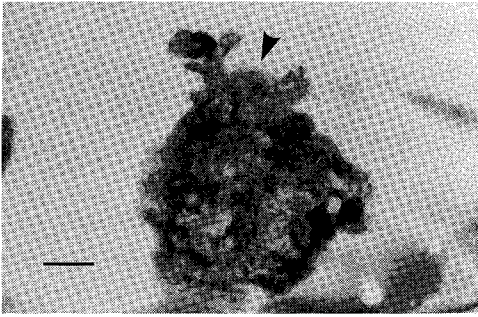


Fig. 1 Shoot regeneration from protoplast-derived calli under 4-PU treatment.
Bar=2 mm

れる球状組織が形成され、そこから茎葉が伸長してくる傾向にあり、茎葉の形態も多くは水浸状を呈した (Fig. 1)。また、平板培地上に多くのカルスを一緒に置床するより、スラント培地に 1 個ずつ置床した場合に明らかな再分化率の上昇が観察されたことから、養分吸収の競合または、エチレン等のガス環境の影響が示唆される。さらにカルスの育成段階で浸透圧の低下を図り、再分化培地に mannitol を添加しなかった場合にも再分化率の上昇が観察されたことから、培地の浸透圧低下はその後の茎葉再生に好適な影響を与えるものと結論できる。同様のことはその他の植物においても認められている^{20–22)}。

尚、BA を用いた場合は、培養方法、浸透圧低下の有無に拘らず、茎葉再生率に有意な差は認められなかった。

(3) 再分化茎葉からの植物体育成

BA により誘導された茎葉は、カルスより分離し、植物ホルモンを含まない B5 培地に移植することにより容易に発根が促され完全な植物体となったが、4-PU により誘導された茎葉は非常に発根性が悪い上、褐変しやすいため、同様の方法を用いても多くは枯死してしまった。そこで、カルスより分離された茎葉を保護しながら成長させて、併せてこれらの茎葉に影響を与えているホルモンを 4-PU から発根に悪影響を及ぼさないと考えられる BA に素早く置換する方法として、NAA 0.1 mg/l, BA 0.5 mg/l を含む液体培地中で 20–30 日間回転培養後シュートを伸長させてから発根培地に移したところ (Fig. 2)、再分化茎葉を非常に効率良く植物体に育成できた。また、カルスより再分化した直後水浸状を呈した茎葉も、「ミリシール」により通気性を持たせた培養器

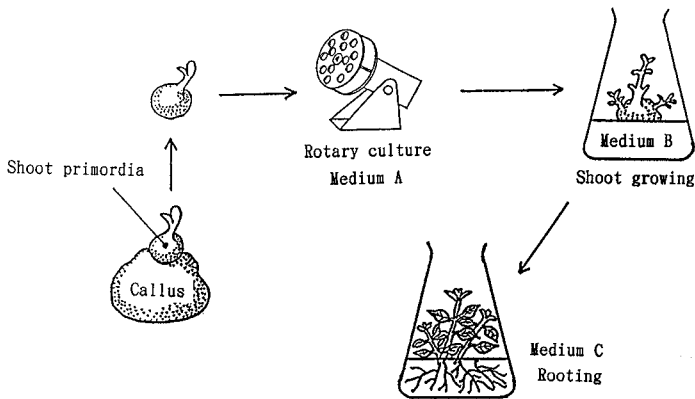


Fig. 2 Effective recovery of rooted plants of peppermint from protoplast-derived shoots regenerated with 4-PU.

Medium A: B5, sucrose 2%, NAA 0.1 mg/l, BA 0.5 mg/l

Medium B: B5, sucrose 2%, NAA 0.1 mg/l, BA 0.5 mg/l, agar 0.8%

Medium C: B5, sucrose 2%, agar 0.8%

内で馴化を続けるうち正常な植物体となり、これらの植物体の鉢上げは非常に容易であった。現在 30 株程度のクローン株を得ているが、形態的に様々な変異が観察される個体もあるため、今後はこれらを圃場栽培し、精油組成に関する変異を調査する予定である。

文 献

- 1) Landing, J. E., 1969. In "American Essence" Kalamazoo public museum. Kalamazoo, Michigan.
- 2) Briquet, J., 1897. In "Engler und Prantl, Natürliche Pflanzenfamilien 4(3a)" *Labiatae* p. 117, *Mentha* p. 317-324.
- 3) Hegi, G., H. Gamo, H. Marzell, 1914. In "Illustrierte Flora von Mitteleuropa. 5(4)" p. 2335-2357.
- 4) 池田長守, 清水純夫, 宇渡清六, 1963. 育種学雑誌, **13**: 31-41.
- 5) Murray, M. J., 1965. 16th Ann. Meeting of Oregon Essential Oil Growers league.
- 6) Murray, M. J., 1969. Induced Mutation in Plants (International Atomic Energy Agency, Vienna), p. 345-371.
- 7) 中山孟郎, 東山龍雄, 阪田 功, 橋爪 斌, 1970, 香料, **97**: 47-56.
- 8) Carlson, P. S., H. H. Smith, R. D. Dearing, 1972. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **69**: 2292-2294.
- 9) Melchers, G., M. D. Sacristan, A. A. Holder, 1978. Carlsberg Res. Commun., **43**: 203-218.
- 10) Ohgawara, T. *et al.*, 1985. Theor. Appl. Genet., **71**: 1-4.
- 11) Grosser, J. W., F. G. Gmitter Jr., J. L. Chandler, 1988. Theor. Appl. Genet., **75**: 397-401.
- 12) Kobayashi, S. *et al.*, 1989. Jpn. J. Genet., **64**: 91-97.
- 13) 佐藤 洋, 榎本末男, 岡 成美, 細見和雄, 伊東禰男, 1991. 第 12 回植物組織培養学会大会・シンポジウム講演要旨集, p. 75.
- 14) Sato, H., S. Enomoto, S. Oka, K. Hosomi, Y. Ito, 1993. Plant Cell Rep., **12**: 546-550.
- 15) Isogai, Y., K. Shudo, T. Okamoto, 1976. Plant Cell Physiol., **17**: 591-600.
- 16) Gamborg, O. L., R. A. Miller, K. Ojima, 1968. Exp. Cell Res., **50**: 151-158.
- 17) Xu, Z. H., M. R. Davey, E. C. Cocking, 1981. Z. Pflanzenphysiol., **104**: 289-298.
- 18) Widholm, J. M., 1972. Stain Technol., **3**: 323-330.
- 19) Tanimoto, S., H. Harada, 1980. Ann. Bot., **45**: 321-327.
- 20) Nagata, T., I. Takebe, 1971. Planta, **99**: 12-20.
- 21) Nishio, T., T. Sato, K. Mori, K. Takayanagi, 1988. Japan J. Breed., **52**: 165-171.
- 22) Acuna, R. J., M. Pena, 1991. Plant Cell Rep., **10**: 345-348.

Summary

The Effect of 4-PU on Protoplast Culture of Peppermint (*Mentha piperita* L.)

Hiroshi SATO*, Sueo ENOMOTO**, Seibi OKA***,
Kazuo HOSOMI* and Yoshio ITO*

*Lotte Central Laboratory Co., Ltd., 3-1-1, Numakage, Urawa, Saitama 336, Japan

**National Research Institute of Vegetables, Ornamental Plants and Tea, Ano, Mie 514-23, Japan

***National Institute of Agrobiological Resources, 2-1-2, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

Protoplast-derived calli of peppermint grown to 2 mm were transferred to differentiation medium containing 0.1 mg/l of NAA, and various concentrations of BA or 4-PU (*N*-phenyl-*N'*-pyridyl urea). 4-PU gave a higher frequency of shoot formation than the 1-5 mg/l of BA used in previous studies.