

細胞融合によるキク (*Dendranthema × grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) とハイイロヨモギ (*Artemisia sieversiana* J. F. Ehrh. ex. Willd) の体細胞属間雑種の作出

篠山治恵*・古田秀雄**・野村幸雄*・土屋孝夫***
前田栲夫****・数馬俊晴*****・真柄紘一*****

Intergenetic Somatic Hybrid Plants produced by Electrofusion between Chrysanthemum (*Dendranthema × grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) and Wormwood (*Artemisia sieversiana* J.F.Ehrh.ex Willd.).

Harue SHINOYAMA, Hideo FURUTA, Yukio NOMURA, Takao TSUCHIYA,
Masuo MAEDA, Toshiharu KAZUMA and Koichi MAKARA.

キク属の栽培キク (*Dendranthema × grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) 「秀芳の力」とヨモギ属のハイイロヨモギ (*Artemisia sieversiana* J.F.Ehrh.ex Willd.) の無菌植物体本葉からプロトプラストを単離し、電氣的に融合し、ゼランガムで包埋して培養し、コロニーを形成させた。コロニーはカルス化培地に移植してカルス化させ、その後再分化培地にて、植物体を再分化させた。順化後、本葉より DNA を抽出し、RFLP 法で雑種検定したところ、全個体に雑種性が認められた。順化した個体のうち13個体が開花した。葉の形状は片親の「秀芳の力」より欠刻が多かった。花形は一重管弁のものが多かったが、平弁や二重、半八重のものも出現した。花粉培地上での花粉管の伸長は認められなかった。混合用土での発根試験では、13個体中11個体は発根しなかった。また、白さび病の病斑は「秀芳の力」より少なかった。今回キク属とヨモギ属において体細胞属間雑種の作出に成功したことを踏まえ、交雑育種では得られなかった形質を持った新しいキク品種育成の可能性を示唆することができた。

Key Words: キク, ハイイロヨモギ, プロトプラスト, 電気融合, 体細胞属間雑種

I 結 言

キクは天平時代 (729~748年) に、中国から日本に伝来したと推測され、それ以後日本人とは深い関わりを持ってきた。現在、日本の最も重要な花卉園芸作物の一つとなっており、福井県でも生産量・生産額ともに第1位を占める花卉品目である。

もともと栽培キクは野生のキク属植物数種の種間雑種で、原種については定説がなく、中国北部に分布する4倍体のハイシマカンギク (*D. indicum* Desmoul. var.

procumbens Kitam.), 中国中部に分布する2倍体のチョウセンノギク (*D. zawadskii* Tzvelev. var. *latilobum* Kitam.), その他相互間の雑種説がある。

キクの育種は、江戸時代中期に始まり、現在も交配や枝変わりなど、従来の育種方法で行われることが多い。キク属は、種間交雑によって種子を形成する場合があります。柴田ら¹⁾ はイソギクとスプレーギクとの種間交雑による品種を育成している。導入できる形質の種類を増やすためには、バイオテクノロジーを利用した新しい育種法の開発が必要である。

一方ハイイロヨモギは草丈2m、葉は2~3回羽状深裂で、4~6mmの筒状花のみの花を咲かせる。日本および中国において、懸崖などの観賞用キクの台木に利用されている。

本農試バイオテク研究グループでは、1992年より、バイオテクノロジーを利用したキクの新品種育成の研究を行っている。1996年には、古田ら²⁾ がキクプロトプラストからの効率的な植物体再分化系を確立した。この手法を利用して、ヨモギ属のハイイロヨモギとキク属のキク「秀芳の力」との電気融合を試み、体細胞属間雑種の作出に

* 福井県農業試験場 園芸・バイオテク部 バイテク研究グループ

** 現 福井県農林水産部 農林水産政策課

*** 現 福井県農業試験場 園芸・バイオテク部 花き研究グループ

**** 福井大学 教育学部

***** 現 福井県農林水産部 農業技術経営課

***** 現 坂井農業改良普及センター

成功した。そしてその特性を評価したので報告する。

II 材料および方法

1. 植物材料

材料として、輪ギク品種「秀芳の力」とハイイロヨモギ(第3図)を用いた。材料となる植物体の茎頂を無菌的に摘出し、植物ホルモンを含まないMS基本培地上で培養し、無菌植物体を作成した。培地に置床した茎頂を25℃、2500ℓx、16時間日長下で育成し、プロトプラスト単離のための材料とした。

2. プロトプラストの単離

無菌植物体の本葉(約1×1cm)の裏面に、メスで1mm角の格子状の傷をつけ、傷をつけた面を下にして酵素液(1%セルラーゼR-10(ヤクルト)、0.5%マセロザイムR-10(ヤクルト)、CPW塩¹⁴⁾、0.4Mマンニトール、pH5.8)に浸漬し、25℃で16時間静置し、プロトプラストを単離した。

ナイロンフィルター(50μmメッシュ)で未消化物を除去し、700rpm.で3分間遠心し、プロトプラストのみを沈殿させた。沈殿したプロトプラストを洗液(0.4Mマンニトール、2mM塩化カルシウム)で3回洗浄した。「秀

芳の力」のプロトプラストは、10mMのIOAで5℃、10分間処理し^{9)、13)}不活化した。プロトプラストは融合前に、各々10×10⁴個/mlになるように、洗液で濃度調整した。

3. 電気融合条件の検討

濃度調整したキクとハイイロヨモギのプロトプラストを等量混合した細胞液を、0.5mlずつシャーレ(直径6cm)に分注した。細胞融合装置SSH-1(島津製作所)の細胞融合チャンバー03(電極間隔2mm)を用いて、電気融合した。細胞液を古田ら²⁾の方法に従って培養し、DCパルス幅とDCパルス電圧がプロトプラスト融合およびコロニー形成におよぼす影響を検討した。

4. 融合プロトプラストの培養

融合したプロトプラストは古田ら²⁾の方法に従い、培養した(第1表,第3図)。

融合したプロトプラストを含む細胞液に、等量の包埋培地を加え、ゲルプレートを作った。これに0.5mlの添加培地を加え、25℃暗黒下で培養した。2週間後うすめ液を1ml添加し、マンニトール濃度を1/2にした。コロニーが直径0.5mm位に生長したら、カルス化培地に移植し、25℃、2000ℓx、16時間日長下で培養した。直径1~1.5mmに生長したカルスを再分化培地に移植し、2週間毎に3回継代し、植物体を再分化させた。再分化した植物体は発根培地に移植し、発根を促した。

第1表 プロトプラスト培養、再分化の培地組成

培地組成	包埋培地	添加培地	うすめ液	カルス化培地	再分化培地	発根培地
無機成分 (mg/l)						
KNO ₃	950	950	950	950	1900	1900
NH ₄ NO ₃		100	100	825	1650	1650
MgSO ₄ ·7H ₂ O	185	185	185	185	370	370
CaCl ₂ ·2H ₂ O	220	220	220	220	440	440
KH ₂ PO ₄	85	85	85	85	170	170
MnSO ₄ ·4H ₂ O	11.15	11.15	11.15	11.15	22.3	22.3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	4.3	4.3	4.3	4.3	8.6	8.6
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0125	0.0125	0.0125	0.0125	0.025	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0125	0.0125	0.0125	0.0125	0.025	0.025
KI	0.415	0.415	0.415	0.415	0.83	0.83
H ₃ BO ₃	3.1	3.1	3.1	3.1	6.2	6.2
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.125	0.125	0.125	0.125	0.25	0.25
Na ₂ EDTA	18.65	18.65	18.65	18.65	37.3	37.3
FeSO ₄ ·7H ₂ O	13.9	13.9	13.9	13.9	27.8	27.8
ビタミン類 (mg/l)						
Inositol	50	50	50	50	100	100
Glycine	1	1	1	1	2	2
Nicotinic acid	0.25	0.25	0.25	0.25	0.5	0.5
Pyridoxine-HCl	0.25	0.25	0.25	0.25	0.5	0.5
Thiamine-HCl	0.05	0.05	0.05	0.05	0.1	0.1
糖 (g/l)						
Sucrose	10	10	10	10	40	30
Mannitol	72.87	72.87				
植物ホルモン (mg/l)						
NAA		1	0.5	0.5		
BA		1	0.5	0.5	0.5	
GA ₃					0.2	
その他						
Gellan Gum(g/l)	4			2	3	2
pH	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8

5. 植物体の順化と栽培

再分化植物体を2日間外気に馴らし、パーミキュライトとパーライトの混合用土（容積比7:3）を詰めたセルトレイ（72穴）に移植し、ガラスハウス内で順化した（1995年10～12月）。生育に合わせて10cmポットに植え替えた。1997年5月にマルチがけした圃場に定植し、葉形・花形などの特性調査を行った。

開花した個体について、試験管および混合用土において発根試験を行った。

6. 雑種検定

順化後の植物体の本葉から、Alkali-SDS法³⁾を用いて、ゲノムDNAを抽出した。制限酵素EcoRVで処理したDNA2μgを0.7%アガロースゲル中で電気泳動し、DIGを用いてサザンハイブリダイゼーションし、RFLP法にて多型を検出した。プローブには農水省農業生物資源研究所高岩文雄氏より分譲されたイネのリボゾームRNA遺伝子 (rDNA) を用いた。

7. 花粉の稔性

開花した花の雄蕊より花粉を採取し、花粉培地（サッカロース10%、寒天1%）に置床し、25℃、2500lx、16時間日長下で培養した。置床より2日後、顕微鏡下で花粉管の伸長を観察した。

III 結果

1. 電気融合条件の検討

DCパルス幅とDCパルス電圧がプロトプラスト融合、およびコロニー形成におよぼす影響を第2表に示した。DCパルス幅50μsでは、DCパルス電圧150Vまではほとんど融合が見られなかったが、200V以上で半分くらいのプロトプラストが2個ずつ融合しているのが確認された。100μsでは、ほとんどのプロトプラストが2～5個ずつ融合した。

各条件で融合したプロトプラストを培養したところ、DCパルス幅50μsではDCパルス電圧150Vまでは細胞の分裂および、コロニー形成は認められなかった。200V以上で細胞の分裂および、コロニー形成が認められた。150V以下のDCパルス電圧では細胞融合が行われなため、コロニー形成が認められなかったと思われる。DCパルス幅100μsでは、150VまでのDCパルス電圧でコロニー形成が認められたが、200V以上では認められなかった。これは200V以上ではプロトプラストが3個以上融合してしまい、細胞容量の限界を越えたためと考えられる。

以上のことから、電気融合条件はDCパルス幅50μs、DCパルス電圧200Vが最適と思われる。この条件で細胞融合を行い、3,864個のカルスを得た。カルスを再分化培地に移植したところ、1,342個体の再分化植物体を得た（第3表）。

第2表 キクとハイイロヨモギの電気融合

電気条件		融合の程度	分裂	コロニー形成
DCパルス幅 (μs)	DCパルス電圧 (V)			
50	100	—	—	—
50	150	—	—	—
50	200	+	++	+++
50	250	++	+	+
50	300	++	+	+
100	100	++	+	++
100	150	++	±	±
100	200	++	—	—
100	250	++	—	—

* +++: 多 ++: 中 +: 少 ±: 僅か —: 無

** 分裂は培養開始2週間目、コロニー形成は培養開始4週間目に調査

第3表 融合細胞の生育経過

カルス数 (個)	再分化植物体数 (個)	順化成功個体数 (個)	定植成功個体数 (個)	開花個体数 (個)
3,864	1,342	509	53	13

2. 再分化植物体の特性調査

再分化植物体1,342個体を1995年10~12月に順化し、そのうち509個体が順化に成功した。1997年5月に圃場に定植したところ、53個体が順調に生育した(第3表)。

また、再分化植物体の開花特性を第4表に示した。開花日は、ハイイロヨモギは8月26日、「秀芳の力」は10月21日、再分化植物体13個体が9月下旬~11月上旬であった。茎葉の生育は、草丈は両親よりも短かく、茎径も両親より細かった。葉数は「秀芳の力」と同程度~2倍の枚数であった。葉長・葉幅は「秀芳の力」より小さいものから大きいものまで、幅広く、「秀芳の力」よりも欠刻が大きかった(第2図)。花の特徴として、形状は一重管弁のものが多かったが、平弁(No.1, 2, 3, 4, 5, 10)や二重(No.1, 2, 3), 半八重(No.4)のものも出現した。花色は白(No.5, 8, 12)の他、ピンク(No.3, 4, 6, 7)や黄色(No.1, 2, 9, 10, 11, 13)のものも見られた。花の直径は10~40mmで、大きさにばらつきがあった。舌状花数は、形状が一重や二重のため「秀芳の力」より極端に少なかった。13個体の中には、花が形成されても十分に開花せず、半開のまま枯死する個体も見られた(第

3図, 第4表)。

花粉培地上に開花した花の花粉を置床したところ、13個体とも花粉管の伸長は認められず、花粉粘性は無いと考えられる。

自然条件下での白さび病の発病程度は、「秀芳の力」より少なかった。

試験管および混合用土における発根試験の結果を第5表に示した。両親と開花した再分化植物体13個体について、1区10本3反復の発根試験を行った。試験管で生育させた無菌植物体を用いて無菌的に挿し芽をし、発根率と発根日数を調べた。「秀芳の力」の発根率は100.0%で、発根日数は平均2.5日、ハイイロヨモギの発根率は85.3%で、発根日数は平均5.3日であった。再分化植物では発根率は100.0%に近く、発根日数は7.5~16.2日であった。また、混合用土への挿し芽を試みたところ、「秀芳の力」の発根率は100.0%、ハイイロヨモギは46.3%、再分化植物体13個体中11個体は発根が認められなかった。発根が認められたNo.1とNo.5の発根率はそれぞれ23.5%と26.8%で、発根日数は11.8日と15.6日であった。

第4表 体細胞属間雑種個体の開花時の特性調査(1997年)

No.	開花日 (月日)	茎葉の生育					花の特徴(舌状花)						
		草丈(cm)	茎径(cm)	葉数	葉長(cm)	葉巾(cm)	形状	色	直径(mm)	舌状花数	粘性	白さび病斑*	開花程度
1	9.26	84	0.5	69	7.2	3.5	二重平弁	薄黄	26	40	無	-	全開
2	10.27	29	0.3	40	5.0	3.0	二重平弁	薄黄	25	45	無	±	全開
3	10.06	72	0.7	80	5.6	3.2	二重平弁	薄桃	13	51	無	-	全開
4	10.07	55	0.5	68	5.2	3.0	半八重平弁	薄桃	16	54	無	-	全開
5	10.16	72	0.6	80	7.2	4.0	一重平弁	白	31	32	無	-	半開
6	10.21	52	0.4	62	5.0	3.5	一重管弁	薄桃	40	38	無	-	全開
7	10.10	19	0.4	80	2.5	3.1	一重管弁	薄桃	10	24	無	-	全開
8	10.26	34	0.4	41	6.2	3.2	一重管弁	白	15	38	無	-	全開
9	10.20	35	0.5	70	4.5	2.0	一重管弁	黄	18	24	無	-	全開
10	10.16	22	0.4	36	3.2	2.0	一重平弁	黄	21	15	無	±	全開
11	10.30	16	0.4	42	3.1	2.0	一重管弁	黄	17	31	無	++	全開
12	11.06	53	0.3	61	4.0	2.0	一重管弁	白	15	12	無	+	半開
13	11.05	50	0.5	62	4.5	2.5	一重管弁	黄	10	30	無	±	半開
秀芳の力	10.21	112	0.8	40	5.2	3.3	八重管弁	白	109	228	無	++	全開
ハイイロヨモギ	8.26	186	1.3	129	9.8	9.0	筒状花のみ	黄	8	-	有	-	全開

*白さび病斑程度 ++:多 +:中 ±:少 -:無

第5表 開花個体における挿し芽発根率と所要日数

No.	試験管		混合用土	
	発根率 (%)	発根日数 (日)	発根率 (%)	発根日数 (日)
1	100.0	7.5	23.5	11.8
2	99.8	16.2	0.0	-
3	100.0	11.0	0.0	-
4	98.8	10.3	0.0	-
5	100.0	6.8	26.8	15.6
6	97.6	11.3	0.0	-
7	99.8	10.8	0.0	-
8	100.0	10.3	0.0	-
9	98.6	14.3	0.0	-
10	96.5	9.6	0.0	-
11	97.3	7.6	0.0	-
12	98.8	8.2	0.0	-
13	100.0	7.2	0.0	-
秀芳の力	100.0	2.5	100.0	6.8
ハイイロヨモギ	85.3	5.3	46.3	10.6

*各品種・個体とも10本×3反復の挿し芽を行った

3. 雑種検定

順化に成功した植物体509個体の本葉からゲノム DNA を抽出し、RFLP 法にて多型を検出した。「秀芳の力」は 5.1 kbp、ハイイロヨモギは 5.9 kbp にそれぞれ特異的なバンドが認められた。再分化植物体では、全個体が両親のバンドを共有しており、雑種性が認められた (第11図)。

IV 考 察

細胞融合に最も強く寄せられてきた期待は、従来の交雑方法では雑種が得られないか、または得ることが困難であるような遠縁の植物間で雑種を育成することであった。体細胞雑種の作出は、プロトプラストの単離、細胞融合、プロトプラスト培養、雑種の選抜、植物体の再分化などに、多大な技術を必要とする。融合に成功しても、融合細胞が分裂しなかったり、生育途中で雑種致死を引き起こしたりするため、多くの植物で体細胞雑種の作出技術を確立するのは困難であった。

丸橋 (1991)⁷⁾ は著書の中で、種間の組合せでは、*Datura* 属、*Nicotiana* 属、*Petunia* 属を中心に、26組合せで雑種植物が得られていると報告している。これらの中には通常の交雑で雑種が得られる組合せもあるが、交雑では極めて稀に雑種ができるにすぎない組合せや全く雑種ができない組合せもある。こうした組合せで容易に雑種が得られる点、さらに直ちに稔性のある複2倍体 (異数体も多い) が得られる点は交雑では望むことができない優れた点である。

属間の組合せではジャガイモ+トマト (ポマト)⁶⁾ をはじめ、6組合せで雑種が得られている。属間雑種の作出は、ナス科⁶⁾、アブラナ科^{1), 9), 12), 13)}、セリ科、ミカン科¹⁵⁾ の4科に限られ、食糧生産上重要なイネ科やマメ科などでは成功していない。また、科を越えた雑種の例はない。これらの研究はどのくらい遠縁の植物間で雑種を得ることができるかという可能性の追求に主眼がおかれたもので、実用化には困難なものが殆どである。前述のポマトは花色や葉形が両親の中間的なものであったが、果実はトマトのように大きくならず稔性も認められず、地下茎もイモにはならなかったため、種子による維持や育種素材にはなり得なかった。このように、体細胞雑種の多くは不稔であり、育種素材には使えないことが多い^{1), 6)}。

細胞融合の実用的な成功例としては、Kumashiro and Kubo ら (1986)^{4), 5)} による細胞質雄性不稔系統を短期間に育成する手法の開発が挙げられる。彼らは細胞質提供種 (*Nicotiana debneyi*) のプロトプラストに 10kR の X 線を照射して核を不活化し、核提供種 (*N. tabacum*) のプロトプラストに融合させ、得られたコロニーから植物体を再分化させた。この中から約 10% の頻度で雄性不稔個体を

得ている。通常の交雑育種では 3~4 年かかるが、この方法を用いることで雄性不稔系統が 6~7 ヶ月で得られるとしている。

キクとキク属の野生キクとの種間雑種の作出は、比較的容易であり、これまでもイソギク等を交配親とした新品種が多数育成されている¹¹⁾。しかしながら属が異なると交雑は不可能となり、今回我々が材料に用いたキク科のキク属 (「秀芳の力」) とヨモギ属 (ハイイロヨモギ) の間でも、通常の交配では雑種が得られない。

そこで、既に「秀芳の力」で確立したプロトプラスト再分化系を利用して、ハイイロヨモギとの細胞融合を試みた。この再分化系を用いることで「秀芳の力」はプロトプラストからコロニー・カルスを経て、比較的容易に再分化するが、ハイイロヨモギはほとんど分裂しない。この特徴を利用して、「秀芳の力」のプロトプラストを IOA 処理^{9), 13)} し、両者の雑種のみが生育できるようにして選抜を行った。その結果、1,342 個体の再分化植物体を得た。順化に成功した再分化個体 509 個体の本葉から DNA を抽出し、RFLP 法にて雑種検定を行ったところ、全個体が「秀芳の力」とハイイロヨモギのバンドを共有する体細胞属間雑種であった。

今回作出された体細胞属間雑種を圃場に定植したところ、13 個体が両親の中間的な形態の花を咲かせたが、花粉管の伸長は認められなかった。また、殆どの個体は発根力が弱く、挿し芽増殖は不可能であるなど、育種素材としての利用は困難であった。

細胞融合の今後の方向として、大澤 (1994)¹⁰⁾ は以下のように述べている。まず培養などで雑種が得られる範囲の比較的近縁な種間雑種は、細胞融合後の植物体が維持され育種素材としても利用しうるので、この実用化を目指した利用が広がるとた。一方遠縁な組合せでは、再分化の過程でどちらか一方の染色体が脱落したり、再分化植物体が不完全で、次代の子孫をとることは勿論、当代の維持が困難であるため、一方の細胞核や細胞質の一部を融合対象にした非対称融合が主流になるとしている。さらに、融合処理から、分裂・コロニー形成・植物体再分化の過程で変異が生じる機会が多いため、変異の幅を拡大する手段としても有効であるとしている。

キクにおいても、今回行った属間での細胞融合だけでなく、比較的近縁な種間の細胞融合や遠縁な組合せでの非対称融合も行い、交雑育種では得られなかった形質をキクに導入して新品種の育成を目指すことが必要であると考えられる。

引用文献

- 1) 古田秀雄, 野村幸雄, 前田樹夫, 真柄紘一 (1996). キク (*Dendranthema × grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) プ

- ロトプラストからの植物体の効率的な再分化. 福井県農業試験場研究報告 33:7-14
- 2) Gleba, Y. Y. and F. Hoffmann (1980). "Arabidobrassica": A noble plant obtained by protoplast fusion. *Planta* 149:112-117
- 3) Honda, H. and A. Hirai (1990). A simple and efficient methods for identification of hybrids using nonradioactive rDNA as probe. *Japan J. Breed.* 40:339-348
- 4) Kumashiro, T. and T. Kubo (1986). Cytoplasm transfer of *Nicotiana debneyi* to *N. tabacum* by protoplast fusion. *Japan J. Breed.* 36:39-48.
- 5) Kumashiro, T. and T. Kubo (1986). Agronomic Traits in Cytoplasmic Male Sterile Tobacco Obtained by Protoplast Fusion. *Japan J. Breed.* 36:284-290.
- 6) Melchers, G., M. D. Sacristan and A. A. Holder (1978). Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. *Carlsberg. Res. Commun.* 43:203-218
- 7) 丸橋亘 (1991). 細胞融合の成功例. 新しい植物育種技術バイオテクノロジーの基盤として (中島哲夫 監修, 榎渕欽也 編) 養賢堂:105
- 8) Murashige, T. and F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497
- 9) Nishio, T., K. Watanabe, T. Sato and M. Hirai (1987). Production of somatic hybrids between *Brassica oleracea* and *Brassica campestris* by electric cell fusion. *Bull. Natl. Res. Inst. Veg. Ornam. Plants and Tea, Japan*, A1:165-172
- 10) 大澤勝次 (1994). 図集 植物バイオテクの基礎知識. 農文協
- 11) 柴田道夫, 川田穰一ら (1988). インギク (*Chrysanthemum pacificum* NAKAI) とスプレーギク (*C. morifolium* RAMAT.) との種間交雑による小輪系スプレーギク 'ムーンライト' の育成経過とその特性. 野菜・茶業試験場研究報告 A.2:252-277
- 12) Taguchi, T. and T. Kameya (1986). Production of Somatic Hybrid Plants between Cabbage and Chinese cabbage through Protoplast Fusion. *Japan J. Breed.* 36:185-189
- 13) Terada, R., Y. Yamashita, S. Nishibayashi and K. Shimamoto (1987). Somatic hybrids between *Brassica oleracea* and *Brassica campestris*: selection by the use of iodoacetamide inactivation and regeneration ability. *Theor Appl. Genet.* 73:379- 384
- 14) Zepata, F. J. and K. C. Sink (1981). Somatic embryogenesis from *Lycopersicon peruvianum* leaf mesophyll protoplasts. *Theor. Appl. Genet.* 59: 265-268
- 15) Yamamoto, M. and S. Kobayashi (1995). A Cybrid Plant Produced by Electrofusion between *Citrus unshu* (satsuma mandarin) and *C. sinensis* (sweet orange). *Plant Tissue Culture Letter*, 12(2), 131-137

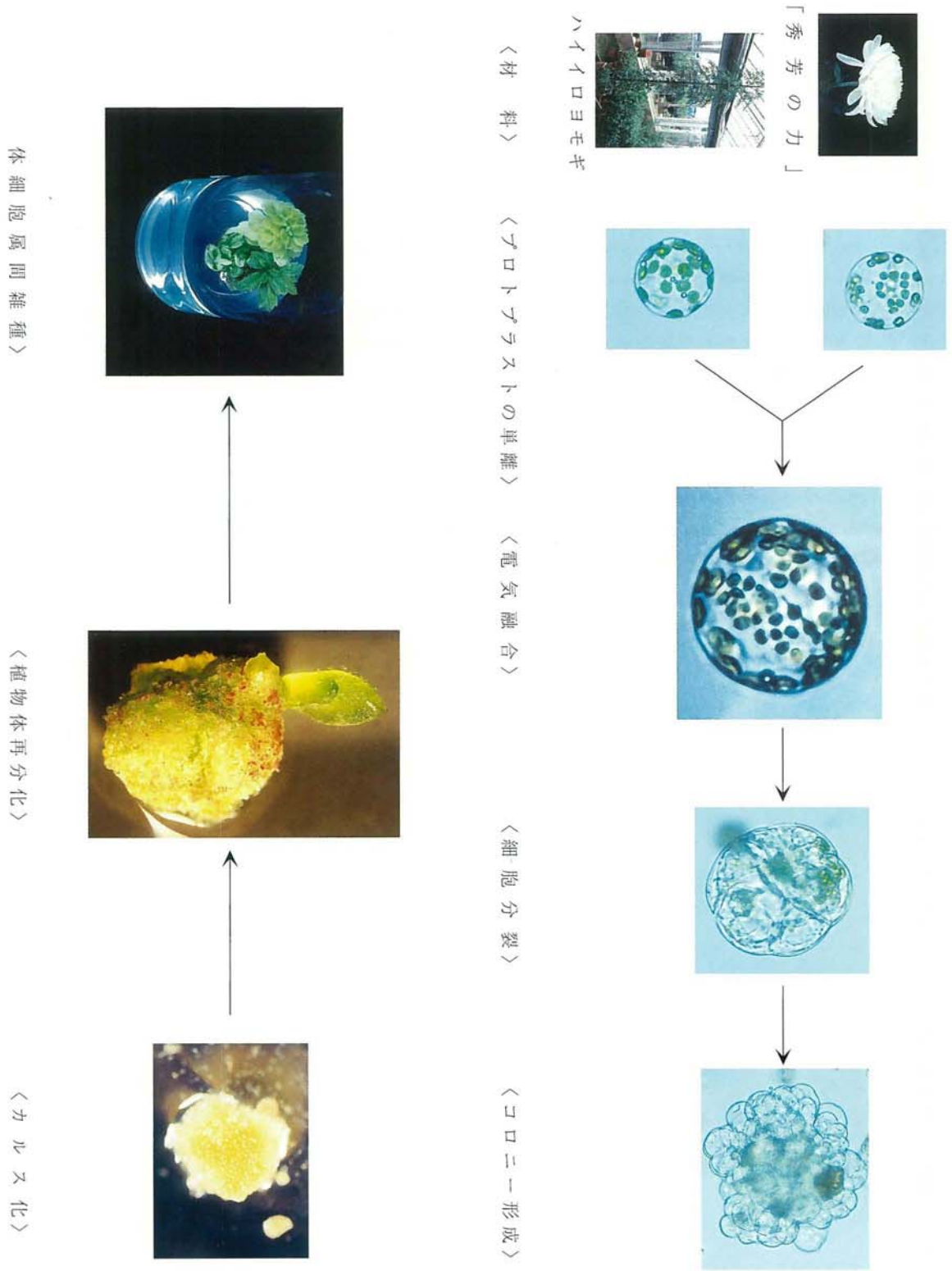
Intergenic Somatic Hybrid Plants produced by Electrofusion between Chrysanthemum(*Dendranthema × grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) and Wormwood (*Artemisia sieversiana* J.F.Ehrh.ex Willd.).

Harue SHINOYAMA, Hideo FURUTA, Yukio NOMURA, Takao TSUCHIYA,
Masuo MAEDA, Toshiharu KAZUMA and Koichi MAKARA.

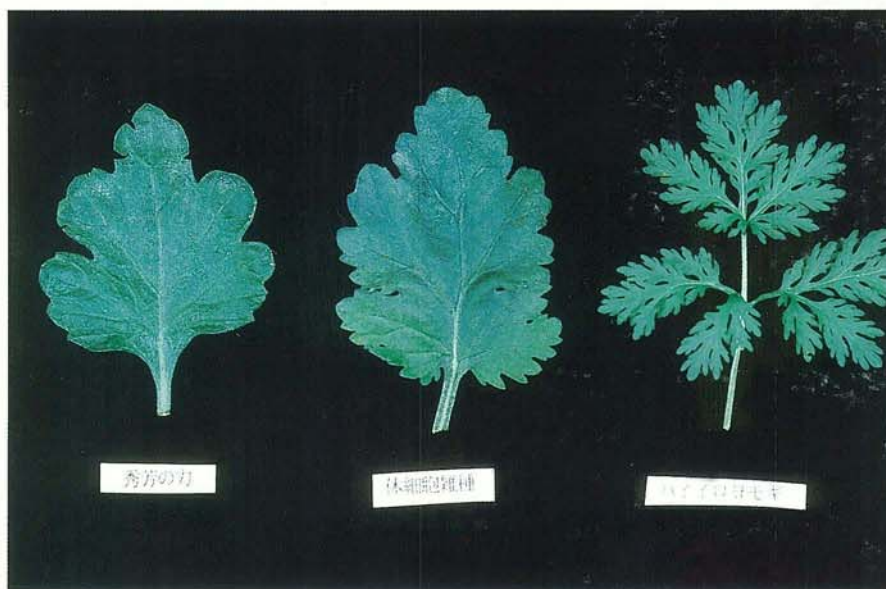
SUMMARY

Intergenic somatic hybrids of chrysanthemum (*Dendranthema × grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) and wormwood (*Artemisia sieversiana* J.F.Ehrh.ex Willd.) were obtained by electrofusion of mesophyll protoplast. Protoplasts were isolated from leaves by treatment with 1.0%(w/v) cellulase R-10(Yakult, Japan) and 0.5%(w/v) Macerozyme R-10(Yakult, Japan) for 16h at 25 °C. Chrysanthemum protoplasts having high plant regeneration ability were inactivated by iodoacetoamido before fusion treatment. Three thousands eight hundreds and sixtyfour calli were obtained and after transferred to a shoot regeneration medium, 1,342 shoots were regenerated. On the hardning in the greenhouse, 509 shoots grew. The hybrid nature of the regenerated plants were confirmed by RFLP analysis and by their morphology. Thirteen somatic hybrid plants flowered in the autumn of 1997. Their colors were white, pale-pink or pale-yellow. The leaf and flower shape were intermediate type of its parents. Pollen fertility of the somatic hybrid plants was 0%. And the growth of the roots of almost plants were very poor.

But this technique may be applicable to intergenic somatic hybrids in the chrysanthemum species for introduction of the more useful mother plants or new cultivar.



第1図. 体細胞属間雑種の作出



第2図. 体細胞雑種の葉形
左：キク「秀芳の力」
中：体細胞雑種
右：ハイイロヨモギ



キク「秀芳の力」



ハイイロヨモギ



No. 1 二重平弁, 薄黄色



No. 3 二重平弁, 薄桃色



No. 4 半八重平弁, 薄桃色



No. 5 一重平弁, 白色



No. 6 一重管弁, 薄桃色



No. 7 一重管弁, 薄桃色

第3図. キク「秀芳の力」, ハイイロヨモギと体細胞雑種の花形