

## トウガラシの胚軸プロトプラストからのカルス形成

佐野智義・日向康吉

東北大学農学部植物育種学研究室  
(〒 980 仙台市堤通雨宮町1-1)

(1986年4月1日受付)

(1986年5月9日受理)

これまでに多くの植物体の各組織からプロトプラストが単離・培養されているが、その培地は、液体培地か寒天培地を用いたものが多い。液体培地は培養細胞から単離したプロトプラストの培養に適しているが、培養途中でプロトプラストがシャーレ中央付近に集合して過密状態となることが多い。寒天培地の場合は、プロトプラストを置床するとき寒天を 40°C 前後に保っておく必要があり、煩わしいだけでなく、プロトプラストへの熱によるショックも少なくないと考えられる。本研究では、常温で液体であり、培養液と混合すると培地を固める性質をもつゲルライトを用いた固形培地で培養を試みた。

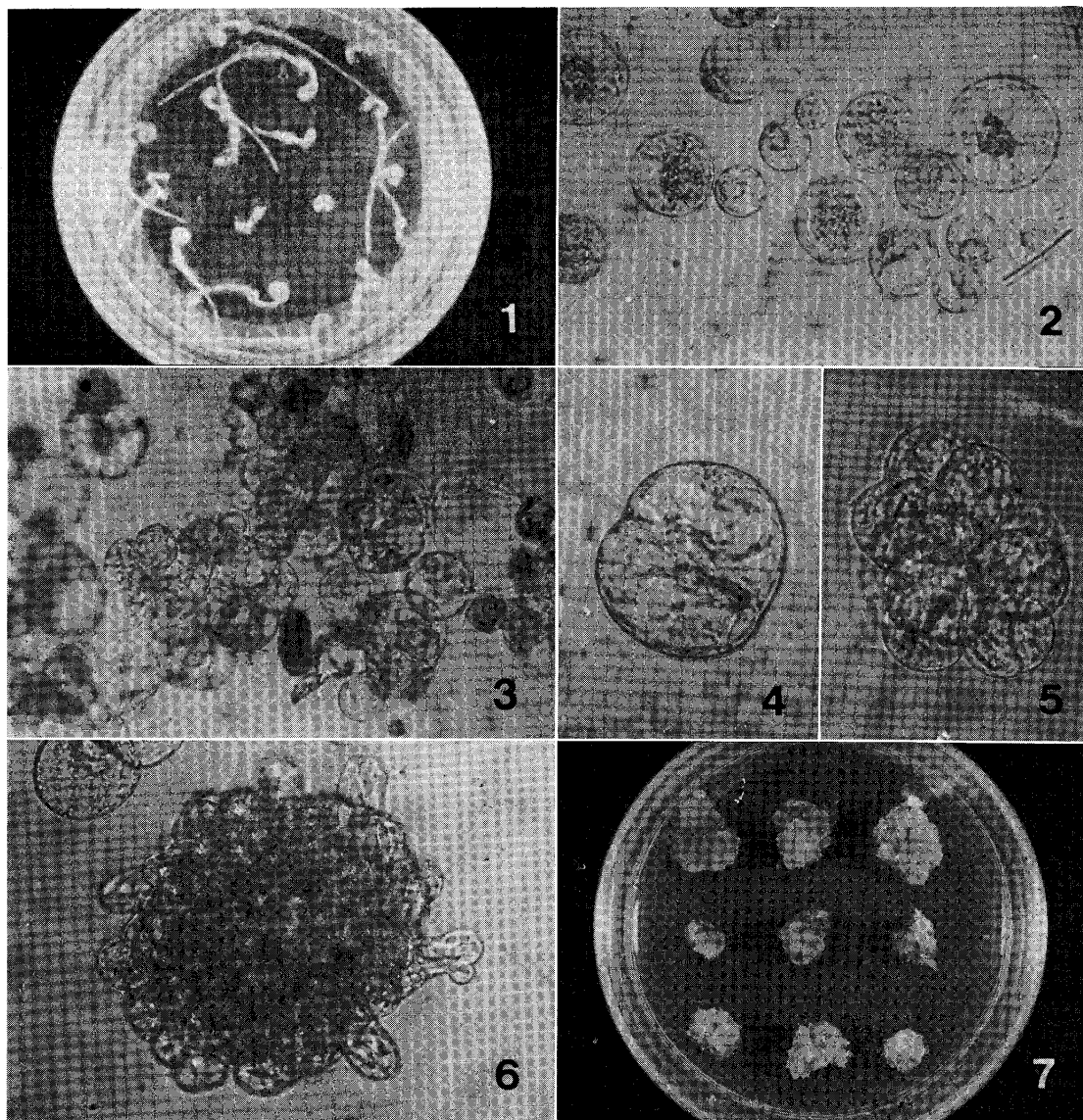
プロトプラストの単離と培養：トウガラシの品種“日光なんばん”の種子を70%エタノールに30秒間浸けてから2%次亜塩素酸ナトリウム液で殺菌した。滅菌水で3回すすいで、1%寒天を入れたシャーレに播種し、パラフィルムでシールして、25°C・暗黒下で種子に吸水させた。約1週間後、30°Cの恒温器(暗黒)に移し、整一に発芽させた。発芽種子は25°C・暗黒下に移して胚軸を伸長させ、胚軸が約1cmに出揃ったところで(第1図)、胚軸を可能な限り細断した。それを酵素液(セルラーゼ・オノズカ R-10 2.0%, マセロチーム R-10 0.35%, マニトール 0.5M, CPW 塩<sup>1)</sup>)に入れ、30°C・50 rpm で10~12時間旋回振盪してプロトプラストを単離した。プロトプラストを含む酵素液は、56μm ナイロンメッシュで濾過し、洗浄液(マニトール:0.5M, CaCl<sub>2</sub>・2H<sub>2</sub>O:0.1%)で3回洗い、最後に20%ショ糖液で精製した。

プロトプラストの培養培地は、グルコース濃度を90g/lに変えた Kao & Michayluk (KM 8 P) 培地<sup>2)</sup>の液体培地と、その液体培地の濃度を2倍にした培養液と0.12%ゲルライト溶液(ゲルライト: *Pseudomonas elodea*の菌体外に生産する多糖類を主成分とし、Gelrite ある

いは Gellan Gum の商品名, Kelco, Division of Merck & Co., Inc.) とを等量混合して固めた固形培地の2つを用い、2,4-D 0.5mg/l, NAA 1.0mg/l, 6-BA 1.0mg/l を添加した。培養ペトリ皿は 35×11mm のものを用いた。プロトプラストの置床密度は、1×10<sup>4</sup>/ml になるように調整した。パラフィルムでシールして、最初の2週間は25°C・暗黒下で、その後は、25°C・14時間日長・光強度 125μEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> で培養した。コロニーの大きさが0.5mm 程度になったところでカルス形成培地(1.0mg/l 2,4-D を含む Murashige & Skoog (MS) 寒天培地<sup>3)</sup>)に移植した。カルスが3mm 程度になったときに、MS を基本培地とし、IAA (4.0, 8.0mg/l) と Kinetin (2.5, 5.0mg/l) を組合せたもの、および NAA (0.01~8.0mg/l) と 6-BA (1.0mg/l) を組み合わせた再分化寒天培地に移植した。

結果および考察：胚軸を酵素処理して得られたプロトプラストの数は、胚軸の新鮮重 1g 当たり、2×10<sup>4</sup>~1×10<sup>6</sup> 個であった(第2図)。プロトプラストは、液体培地と固形培地の両者において、3~4日後に分裂を開始した。第一分裂の頻度は、液体培地で8~9%であった。1週間程度経つとシャーレの中央付近に、分裂している細胞や死滅した細胞が集合して来て過密状態になり(第3図)、その後の細胞の生長が抑制され、カルス塊は見られなかった。一方、細胞の集合を防ぐためにゲルライト溶液を加えた固形培地では、第一分裂の頻度が20%前後に高まり、細胞の集合が起こらず分裂・生長が妨げられなかった(第4, 5図)。

固形培地において、カルスは約2週間後に0.5mm 程度まで生長した(第6図)。この時点でのカルス形成率は、置床したプロトプラスト数に対して10%程度であった。カルス形成培地に移植し、培養2カ月後には3mm 程度まで生長した。これを再分化培地に移植したが、培



- 第1図 供試したトウガラシの胚軸  
 第2図 胚軸から単離したプロトプラスト  
 第3図 液体培地におけるプロトプラストの集合  
 第4図 ゲルライト固形培地における最初の細胞分裂  
 第5図 同じく培養1週間後の細胞  
 第6図 培養約2週間後に得られたコロニー  
 第7図 胚軸プロトプラスト由来のカルス

養6カ月を経過しても再分化は見られなかった(第7図)。

*Capsicum* 属においてプロトプラストから植物体が再生した例は、Saxena ら<sup>4)</sup>の葉肉プロトプラストを用いて成功したという報告があるだけで、プロトプラストから

の再分化は一般に困難なようである。本研究においては、当初、葉肉やカルスからプロトプラストを単離して培養してみたが、カルス形成はまったく見られなかった。そこで、Glimelius<sup>5)</sup>がアブラナ科植物を用いて行ったように、胚軸からプロトプラストを単離して培養した

ところ細胞分裂が起こり、引き続いてカルス形成が見られた。胚軸は分裂活性の高いプロトプラストを得るのに適した材料であった。

プロトプラスト由来カルスを、ホルモン濃度をかえた各種の再分化培地に移植したが、再分化個体は得られなかった。培地条件についてさらに検討する必要がある。

本研究で用いたゲルライトは、二価カチオンによりゲル状となり培地を固めるもので、液体培地と混合すると固まる性質がある。今回の実験においては、2倍濃度の液体培地とゲルライト溶液を用意し、プロトプラストをシャーレに置床する段階で等量混合する方法をとった。この方法によれば、プロトプラストに熱ショックを与えずに細胞の集合を抑制できるし、しかも透明なため観察

に便利でプロトプラストの初期培養に有効であることがわかった。

## 文 献

- 1) Street, H.E., 1973. In "Plant Tissue and Cell Culture," p. 113-114, Blackwell Scientific Publications, London.
- 2) Kao, K.N., M.R. Michayluk, 1975. *Planta*, **126** : 105-110.
- 3) Murashige, T., F. Skoog, 1962. *Physiol. Plant.*, **15** : 473-497.
- 4) Saxena, P.K., R. Gill, A. Rashid, S.C. Maheshwari, 1981. *Protoplasma*, **108** : 357-360.
- 5) Glimelius, K., 1984. *Physiol. Plant.*, **61** : 38-44.

## Summary

### Callus Formation from Hypocotyl Protoplasts of Red Pepper (*Capsicum annuum* L.)

Tomoyoshi SANO and Kokichi HINATA

*Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai 980, Japan*

Protoplasts obtained from hypocotyls of *Capsicum annuum* L. proliferated well in a medium solidified with Gelrite. The solid medium was considered to be effective to escape from detrimental cell coagulation that was often observed in liquid media. Solidifying a medium at a room temperature may be another merit of this gelling substance.