

## キュウリ子葉プロトプラストからのカルスおよび根の形成

景山幸二・矢部和則・宮島成寿

愛知県農業総合試験場  
(〒480-11 愛知県愛知郡長久手町)

(1989年1月13日受付)

(1989年4月17日受理)

新しい作物育種法として、細胞選抜や細胞融合、遺伝子導入などの細胞レベルにおける育種技術が急速に進み、プロトプラスト培養は、この基礎技術の一つとなっている。プロトプラスト培養については、すでにナス科やアブラナ科作物では多くの報告があり<sup>1,2)</sup>、プロトプラストからの植物体再生が比較的容易になってきた。しかし、キュウリなどウリ科作物では研究例が少なく、培養が困難とされている<sup>3-8)</sup>。

本報では、キュウリの子葉プロトプラストの基本的培養条件を明らかにするため、子葉を用いたプロトプラストの単離・培養した結果について報告する。

キュウリ (*Cucumis sativus* L., 品種: 王金促成) の種子を、70% エタノールに1分、ついで有効塩素濃度0.5%の次亜塩素酸ナトリウムに30分浸漬、または10%過酸化水素水に20分浸漬して表面殺菌後、滅菌水で3回洗浄した。BCPプレートカントアガール(日水製薬)を8g/l添加した培地に殺菌種子を置床し、25°C、16時間照明で培養して、発芽、生育させた。約1週間後、展開した子葉を採取し、CPW塩<sup>9)</sup>を含む0.5Mマンニトール液(CPW塩液)中で細断した。0.05%ペクトリナーゼY-23、1%セルラーゼオノズカRS、0.5%デキストラン硫酸カリウム、0.5Mマンニトールを含むpH 5.8の酵素液に細断した子葉を入れ、27°C、80rpmで約2時間往復振とうした。プロトプラストを含む酵素液は、165メッシュのステンレスメッシュで濾過し、100×gで3分間遠心した後、沈澱としてプロトプラストを回収した。さらに、CPW塩液に懸濁し、遠心回収する操作を3回繰り返す。酵素液を完全に除いた。洗浄後のプロトプラストは、2×10<sup>5</sup>個/mlの密度で0.5Mマンニトールに懸濁した。

プロトプラスト培養培地には、Murashige & Skoog

(MS)培地<sup>10)</sup>の無機塩を2倍に希釈し、マンニトールを0.5M添加した培地を基本培地とした。ホルモンとして $\alpha$ -naphthalene acetic acid (NAA)と6-benzylaminopurine (BA)および2-isopentenyladenine (2ip)をTable 1に示す濃度で調製した。プロトプラストは、3週間暗所で培養し、初期分裂が観察されたものからマンニトール濃度を0.25Mに下げた培地に移植し、16時間照明(5,000 lux)で2~3週間培養してコロニー形成を促した。直径0.5mm前後に生育したコロニーをコロニー形成と同一のホルモン条件で寒天を0.8%添加したMS培地に移植し、16時間照明で3~4週間培養してカルス形成を試みた。直径2mm以上の大きさに生育したコロニーをカルスとして形成率を調査した。カルスから植物体を誘導するため、NAA 0.5 mg/l+BA 0.5 mg/l および NAA 2.5 mg/l+BA 0.5 mg/l 添加培地で形成されたカルスを用い、ホルモンをNAA+BA、 $\beta$ -indoleacetic acid (IAA)+BA+ジベレリン(GA<sub>3</sub>)、IAA+ゼアチン、2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)+BAの組み合わせで添加したMS培地へ移植した。培養は、25°C、16時間照明で行った。

本実験の酵素処理条件では、プロトプラストは子葉1枚当たり約3×10<sup>5</sup>個と大量に単離できた(Fig. 1)。プロトプラストの分裂は、供試したすべてのホルモン条件で認められ、分裂始期もいずれの培地でも培養約4日目と同一であった。分裂率は、NAA 0.5 mg/lと2ip 5 mg/l または BA 0.5, 2.5 mg/l を組み合わせたホルモン条件で高かった。BA, 2ipとも0.1 mg/lの低濃度では、NAA濃度に関わらず分裂率が極めて低かった(Table 1, Fig. 2)。

形成されたコロニーの生育については、NAA+BAの組み合わせがよかった。NAA+2ipのホルモン組み

合わせでは、NAA が 0.05 mg/l と低濃度の時プロトプラストの初期分裂は認められたが、その後分裂は停止しコロニー形成には至らなかった。コロニーは、培養 5~6 週間で直径 0.5 mm 程度の大きさになり、いずれの培地でも緑色であった (Fig. 3, Table 1)。マンニトールを含まない寒天培地に移植したコロニーからカルスが形成される割合は、コロニーの生育がよいホルモン条件で高

い形成率を示し、特に NAA 0.5 mg/l+2 ip 0.1 mg/l, NAA 2.5 mg/l+BA 0.5 mg/l での形成率が高かった。プロトプラスト分裂率とカルス形成率を乗じて算出した Plating efficiency<sup>9)</sup> を比較すると (Table 1), プロトプラスト培養に適したホルモン条件は NAA+BA の組み合わせが良く、最適濃度は NAA 0.5 mg/l+BA 0.5, 2.5 mg/l であった。

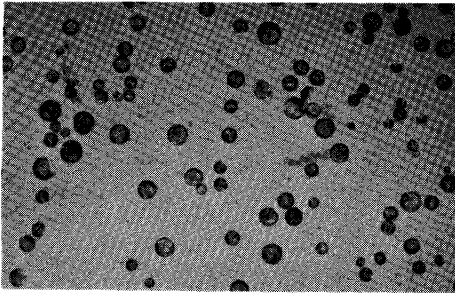


Fig. 1. Protoplasts isolated from cucumber cotyledon.

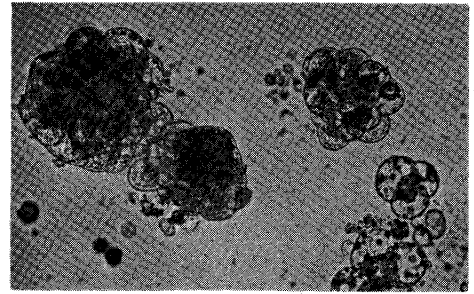


Fig. 2. Cell colonies from cotyledon protoplasts.

Table 1. Effect of hormone combinations on cotyledon protoplast culture of cucumber.

Hormone (mg/l)			Division rate % (A) <sup>a)</sup>	Colony growth <sup>b)</sup>	Callus formation rate % (B) <sup>c)</sup>	Plating efficiency % <sup>d)</sup>	Root formation rate % <sup>e)</sup>
NAA	BA	2 ip					
0.05		0.1	0.3	—	—	—	—
0.05		0.5	4.4	—	—	—	—
0.05		2.5	14.3	—	—	—	—
0.05		5.0	12.0	—	—	—	—
0.5		0.1	8.3	+++	91.3	7.6	34.7
0.5		0.5	16.5	++	14.7	2.4	2.0
0.5		2.5	12.3	++	14.0	1.7	3.3
0.5		5.0	21.0	++	8.6	1.8	0.7
0.5	0.1		1.1	±	1.7	0.0	0.0
0.5	0.5		20.2	+++	68.0	13.7	0.4
0.5	2.5		19.4	+++	67.9	13.2	0.0
2.5	0.1		3.7	++	44.3	1.6	3.4
2.5	0.5		13.6	+++	82.6	11.2	0.4
2.5	2.5		15.6	+	6.8	1.1	0.0
5.0		3.0	17.9	+	0.0	0.0	0.0

<sup>a)</sup> Protoplasts were cultured at 25°C in dark for 3 weeks. MS medium with half strength of inorganic elements and 0.5 M mannitol was used as the basal medium.

<sup>b)</sup> After 3 weeks of culture the initial media were replaced by the new media which contained the same medium components except for 0.25 M mannitol. Colony growth was examined after 2-3 weeks of further incubation at 25°C under 16 hr photoperiod. —: no growth, +: slight, ++: moderate, +++: vigorous.

<sup>c)</sup> The protoplast-derived colonies were transferred onto callus culture media which contained the same hormone combinations, the components of MS medium, and 0.8% agar without mannitol. More than 2 mm calli and the rooted calli were recorded after 3-4 weeks of further incubation. The figures reveal the percentages of the formed calli from the colonies and the rooted calli to the transferred colonies.

<sup>d)</sup>  $A \times B \div 100$

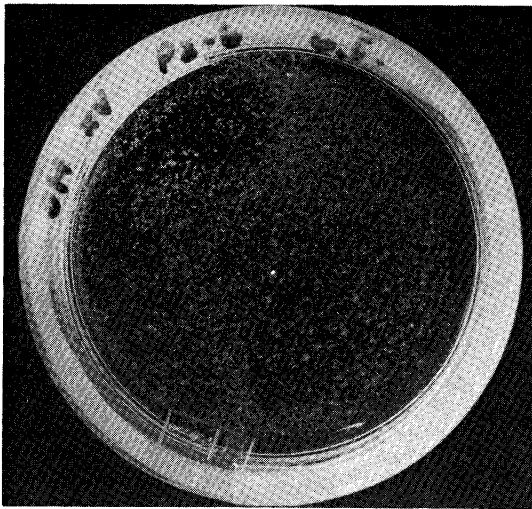


Fig. 3. Visible colony formation from cotyledon protoplasts.

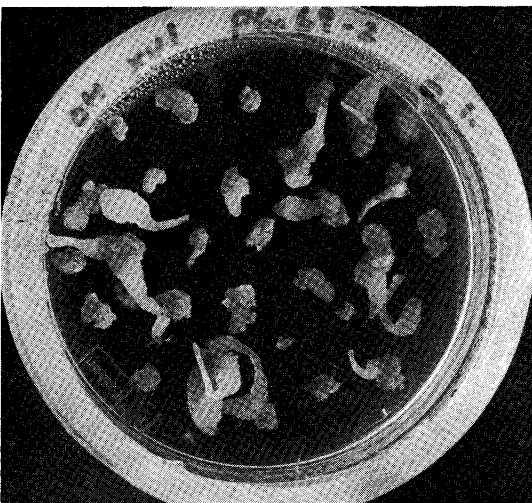


Fig. 4. Callus and root formation from protoplast-derived colonies.

根の形成は、NAA+BA より NAA+2 ip の組み合わせで多く認められ、NAA 0.5 mg/l+2 ip 0.1 mg/l 添加培地で最も高い形成率を示した。根は、2 mm 以下のコロニーからも形成され、本実験のホルモン条件では早い時期から根の分化が始まっているのが認められた (Fig. 4)。

カルスからの植物体再生を試みるため、高い Plate efficiency を示した NAA 0.5 mg/l+BA 0.5 mg/l, NAA 2.5 mg/l+BA 0.5 mg/l 添加培地で形成されたカルスを IAA, NAA, BA, ゼアチン, GA<sub>3</sub> を種々の濃度で組み合わせた培地で培養したが、植物体再生が認

められなかった。

Orczyk and Malepszy<sup>8)</sup>は、Gy-3 系統を用いて NAA 5 mg/l+2 ip 3 mg/l 添加培地で培養しキュウリのプロトプラストから植物体再生に成功しており、本実験においてもこのホルモン条件で品種王金促成を用いて培養を試みたが、分裂およびコロニー形成までで植物体再生はできなかった。これは、Jia ら<sup>4)</sup>のキュウリのプロトプラスト培養や Wehner and Locy<sup>11)</sup>のキュウリ子葉のカルス培養で示された植物体再分化能における品種間差異が原因として考えられる。また、キュウリではプロトプラストから植物体再生が認められた品種においても再分化率は低く<sup>4)</sup>、プロトプラスト培養系に適した品種の選定が重要と考えられる。

キュウリのプロトプラスト培養で、プロトプラストの単離材料として子葉や本葉が一般的に用いられている。しかし、これまで培養が困難とされてきたイネでは、培養細胞から単離したプロトプラストを用いることで植物体再生に成功しており<sup>12-14)</sup>、キュウリでもプロトプラストの単離材料についても検討する必要があると思われる。

## 文 献

- 1) Ohyama, K., J. P. Nitsch, 1972. *Plant Cell Physiol.*, **13**: 229-236.
- 2) Fu, Y., S. Jia, Y. Lin, 1985. *Theor. Appl. Genet.*, **71**: 495-499.
- 3) Coutts, R. H. A., K. R. Wood, 1977. *Plant Sci. Lett.*, **9**: 45-51.
- 4) Jia, S., Y. Fu, Y. Lin, 1986. *J. Plant Physiol.*, **124**: 393-398.
- 5) Matsumoto, S., M. Ito, H. Konishi, I. Takebe, 1987. *Plant Tissue Cult. Lett.*, **4**: 35-37.
- 6) Matsumoto, S., I. Takebe, 1987. *Plant Tissue Cult. Lett.*, **4**: 18-21.
- 7) Moreno, V., L. Zubeldia, L. A. Roig, 1984. *Plant Sci. Lett.*, **34**: 195-201.
- 8) Orczyk, W., S. Malepszy, 1985. *Plant Cell Rep.*, **4**: 269-273.
- 9) Zapata, F. J., P. K. Evans, J. B. Power, E. C. Cocking, 1977. *Plant Sci. Lett.*, **8**: 119-124.
- 10) Murashige, T., F. Skoog, 1962. *Physiol. Plant.*, **15**: 473-497.
- 11) Wehner, T. C., R. D. Locy, 1981. *HortScience*, **16**: 759-760.
- 12) Fujimura, T., M. Sakurai, H. Akagi, T. Negishi, A. Hirose, 1985. *Plant Tissue Cult. Lett.*, **2**: 74-75.
- 13) Kyojuka, J., Y. Hayashi, K. Shimamoto, 1987. *Mol. Gen. Genet.*, **206**: 408-413.
- 14) Toriyama, K., K. Hinata, T. Sasaki, 1986. *Theor. Appl. Genet.*, **73**: 16-19.

## Summary

### Callus and Root Formation from Cotyledon Protoplast of Cucumber (*Cucumis sativus* L.)

Kohij KAGEYAMA, Kazunori YABE and Shigetoshi MIYAJIMA

*Aichi-ken Agricultural Research Center, Aichi-gun, Aich 480-11, Japan*

This paper deals with the effects of hormone combinations on protoplast culture of cucumber (*Cucumis sativus* L. cv. 'Ohgonsokusei'). Protoplast isolated enzymatically from cotyledon divided over a wide range of the hormone combinations tested here. The media containing 0.5-2.5 mg/l NAA+0.5-2.5 mg/l BA and 0.5 mg/l NAA+0.1 mg/l 2 ip were particularly suitable for callus and root formation from protoplast-derived colonies, respectively. Various combinations of hormones have been tried for inducing plant regeneration from callus culture, but the attempt has so far been unsuccessful.