

キュウリ子葉組織からのカルス形成および植物体再生

景山幸二*・矢部和則・宮島成壽

愛知県農業総合試験場
(〒480-11 愛知県愛知郡長久手町)

(1990年5月7日受付)

(1990年5月31日受理)

キュウリ子葉組織からのカルスおよび不定芽形成における各種オーキシンとサイトカイニンの組合せに対する反応の差異と品種間差異について検討した。王金促成を用いた各種ホルモンの組合せおよび濃度に対する反応は、IAA+Kinetin ではカルス形成、不定芽形成とも劣り、IAA+BA および NAA+BA では広い濃度範囲で容易にカルス形成が認められた。しかし、不定芽形成過程はオーキシンの種類で差があり、IAA+BA では、IAA が低濃度の場合は子葉の切断面から直接、そして、高濃度の場合はカルス上に不定芽が形成され、NAA+BA では NAA 0.1~1 mg/l+BA 0.5 mg/l でカルス上に不定芽が形成された。形成された不定芽は、ホルモンフリーの MS 培地に移植することにより植物体に再生した。供試した 5 品種間で植物体再生能および不定芽形成のための最適培地条件に差異が認められた。また、王金促成は、供試品種中で最も植物体再生能が高いと考えられた。

1. 緒 言

キュウリは、連作によりつる割病など防除の困難な土壌伝染性の病害の多発が問題になっており、効率的で安全な手段である抵抗性品種の育成が強く望まれている。

しかし、キュウリは種間交雑がほとんど不可能で病害抵抗性品種の育種が困難な状況である。近年、細胞レベルにおける育種技術が進み、病原菌毒素を用いた細胞選抜が行われ、ジャガイモ^{1,2)}、タバコ³⁾、トウモロコシ^{4,5)}などで病害抵抗性植物が作出されている。キュウリにおいてもこの育種技術が適用できると考えられるが、細胞選抜の基礎となるカルス培養は安定した技術になっていない。

本研究では、キュウリ子葉組織からのカルスおよび不定芽形成における各種オーキシンとサイトカイニンの組み合わせに対する反応の差異と品種間差異について検討した。

2. 材料および方法

子葉培養：供試品種は、王金促成を用いた。種子は、70% エタノールに 1 分、有効塩素 0.5% 次亜塩素酸ナトリウム溶液に 10~15 分浸漬後、滅菌水で 3 回洗浄して表面殺菌を行い、BCP プレートカウンターアガール

(日本製薬) を蒸留水 1 l 当たり 8 g 添加した培地上に置床した。25°C, 16 時間照明で約 1 週間培養後、展開した子葉を中肋と直角に平均 1~2 mm 幅で切断して外植体とした。

培地は、3% ショ糖、0.8% 寒天を加えた MS 培地⁶⁾を用いた。ホルモンは、 β -Indoleacetic acid (IAA) と Kinetin, IAA と 6-Benzylaminopurine (BA) および 2-Naphthaleneacetic acid (NAA) と BA を Table 1~3 に示す組合せで添加したものを用いた。培養は、1 培地当たり 10~19 の外植体を置床し、25°C, 3,000 lux の 16 時間照明で 2 ル月行い、供試外植体数当たりのカルス形成数、不定根形成数および不定芽形成数を調査し、それぞれの形成率を算出した。形成された不定芽は、ホルモンフリーの MS 培地へ移植して生育促進と発根を図った。

品種間差異：品種は、シャープ 1, 加賀節成、四葉、ときわ地這および王金促成（対照品種）の 5 品種を用いた。培地のホルモン条件は、王金促成で不定芽形成が認められたホルモンの種類、濃度を中心にして Table 4, 5 に示す条件とした。種子の表面殺菌は、王金促成と同様または 10% 過酸化水素水 30 分浸漬を行った。外植体、培養環境および調査方法も王金促成と同一条件で行った。

* 現在：岐阜大学農学部

置床する外植体数は、1培地当たり10~19とした。

3. 結 果

(1) 子葉培養における各種ホルモンの影響

IAA+Kinetinの組み合わせでは、Kinetin濃度が高い程カルス形成率が高くなつたが、その形成率は供試した3つのホルモンの組み合わせの中で最も低かった。不定芽は、外植体およびカルスのいずれからも形成されなかつた (Table 1)。

Table 1. Effect of IAA and kinetin combinations on callus, root, and shoot formation from cotyledon explants of cucumber, *Cucumis sativus*, 'Ohgonsokusei'.^a

Hormone (mg/l)		Formation (%)		
IAA	Kinetin	Callus	Root	Shoot
0	0	0	0	0
0	0.01	10	0	0
0	0.1	20	0	0
0	0.5	30	0	0
0	1.0	10	0	0
0	5.0	60	0	0
0.01	0	0	0	0
0.01	0.01	0	0	0
0.01	0.1	10	0	0
0.01	0.5	10	0	0
0.1	0	10	0	0
0.1	0.01	0	0	0
0.1	0.1	0	0	0
0.1	0.5	0	0	0
0.1	1.0	10	0	0
0.1	5.0	0	0	0
0.5	0	0	0	0
0.5	0.01	0	0	0
0.5	0.1	0	0	0
0.5	0.5	0	0	0
0.5	1.0	0	0	0
0.5	5.0	60	0	0
1.0	0	10	0	0
1.0	0.01	0	0	0
1.0	0.1	0	0	0
1.0	0.5	0	0	0
1.0	1.0	20	40	0
1.0	5.0	60	30	0
5.0	0	0	0	0
5.0	0.01	0	0	0
5.0	0.1	10	0	0
5.0	0.5	0	0	0
5.0	1.0	20	0	0
5.0	5.0	0	0	0

^a MS medium was used as the basal medium. Cotyledon explants were cultured at 25°C under 16 hr photoperiod for 2 months.

IAA+BAの組合せでは、すべての培地でカルス形成が認められ、IAA濃度が0.2mg/l以下ではBA濃度が高い程カルス形成率が高くなる傾向がみられた。不定芽は、IAA 0.2mg/l+BA 0.2, 0.5mg/lでは子葉の切断面から直接形成された。また、IAA 1mg/l+BA 1mg/l, IAA 2.5mg/l+BA 0.5mg/l, IAA 5mg/l+BA 0.5, 1mg/lでは、カルス上に不定芽が形成された。IAA 2.5mg/l+BA 0.5mg/lおよびIAA 5mg/l+BA 1mg/l培地で形成された不定芽は、ホルモンフリーのMS培地に移植し生育を図ったが、いずれも植物体再生は認められなかつた。他の培地で形成された不定芽は、ホルモンフリーのMS培地で1~2か月培養することにより植物体に再生した (Table 2)。

Table 2. Effect of IAA and BA combinations on callus, root, and shoot formation from cotyledon explants of cucumber, *C. sativus*, 'Ohgonsokusei'.^a

Hormone (mg/l)		Formation (%)		
IAA	BA	Callus	Root	Shoot
0.1	0.1	50	0	0
0.1	0.5	90	0	0
0.1	2.5	100	0	0
0.2	0.1	20	0	0
0.2	0.2	90	20	30 ^{b,c}
0.2	0.5	100	0	10 ^{b,c}
0.2	1.0	100	0	0
0.2	2.5	100	0	0
0.2	5.0	100	0	0
0.5	0.1	90	0	0
0.5	0.5	100	0	0
0.5	2.5	100	0	0
1.0	0.1	60	0	0
1.0	0.2	100	0	0
1.0	0.5	90	0	0
1.0	1.0	100	0	10 ^c
1.0	2.5	100	0	0
2.5	0.1	100	0	0
2.5	0.5	100	0	10
2.5	2.5	100	0	0
5.0	0.1	90	0	0
5.0	0.2	100	0	0
5.0	0.5	100	60	80 ^c
5.0	1.0	100	0	20
5.0	2.5	100	0	0

^a MS medium was used as the basal medium. Cotyledon explants were cultured at 25°C under 16 hr photoperiod for 2 months.

^b Shoots were directly formed from the cut end of cotyledon explants.

^c Plantlets were induced from shoots by subculture on hormone-free MS medium.

NAA+BA の組合せでは、カルス形成は容易であり、NAA を 0.1 mg/l 以上添加した培地では、BA の濃度に関わらず 100% の形成率を示した。不定芽は、NAA 0.1, 0.2, 1 mg/l +BA 0.5 mg/l でカルス上に形成された。このうち、NAA 0.5 mg/l +BA 0.5 mg/l で形成された不定芽は、ホルモンフリーの MS 培地に移植することにより植物体に再生した。他の培地で形成された不定芽は、生育、発根とも認められなかった (Table 3)。

IAA+BA および NAA+BA の組合せで形成された不定芽のうち発根して草丈 5 cm 以上に生育した植物体では、雄花が形成された (Fig. 1, 2)。

(2) 子葉培養における品種間差異

供試した加賀節成、四葉、ときわ地這、シャープ 1 お

Table 3. Effect of NAA and BA combinations on callus, root, and shoot formation from cotyledon explants of cucumber, *C. sativus*, 'Ohgonsokusei'.^a

Hormone (mg/l)		Formation (%)		
NAA	BA	Callus	Root	Shoot
0	0	0	0	0
0	0.1	11	0	0
0	0.5	67	0	0
0	1.0	78	11	0
0	5.0	100	0	0
0.1	0	100	44	0
0.1	0.1	100	22	0
0.1	0.5	100	16	11
0.1	1.0	100	0	0
0.1	5.0	100	0	0
0.5	0	100	100	0
0.5	0.1	100	100	0
0.5	0.5	100	42	26 ^b
0.5	1.0	100	11	0
0.5	5.0	100	0	0
1.0	0	100	100	0
1.0	0.1	100	100	0
1.0	0.5	100	68	16
1.0	1.0	100	22	0
1.0	5.0	100	0	0
5.0	0	100	100	0
5.0	0.1	100	67	0
5.0	0.5	100	33	0
5.0	1.0	100	0	0
5.0	5.0	100	0	0

^a MS medium was used as the basal medium. Cotyledon explants were cultured at 25°C under 16 hr photoperiod for 2 months.

^b Plantlets were induced from shoots by subculture on hormone-free MS medium.



Fig. 1. Shoot formed on callus derived from cotyledon.

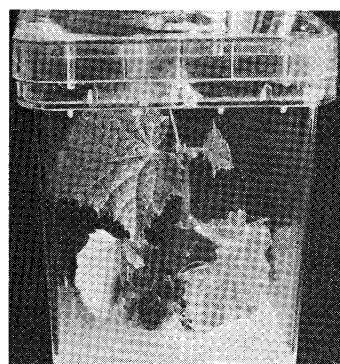


Fig. 2. Plant regenerated from cotyledon.

より王金促成の 5 品種において、カルス形成率は IAA 0.2 mg/l +BA 0.2 mg/l ではいずれの品種も 0~30% と低く、それより高濃度では 80~100% と高率でカルス形成能に品種間差異は認められなかった。不定芽形成は品種による差が認められ、王金促成と四葉では形成されたが他の 3 品種は形成されなかった。王金促成は IAA 7.5, 10 mg/l +BA 0.5 mg/l , 四葉は IAA 7.5 mg/l +BA 0.5 mg/l 培地でそれぞれ 10% の形成率を示した。この 2 品種のうち、不定芽をホルモンフリーの MS 培地に移植することにより発根して植物体再生した品種は、王金促成のみであった (Table 4)。

NAA+BA の組合せでは、IAA+BA の組合せと同様、カルス形成に品種間差異はなく、いずれの品種においても 100% の形成率を示した。不定芽は、すべての品種で形成されたが、形成されたホルモン条件および形成率は品種により異なった。ホルモンに対する反応は、王金促成と加賀節成、ときわ地這とシャープ 1 がそれぞれ同じ傾向を示した。不定芽形成率は、王金促成とときわ地這が高かった。また、形成された不定芽をホルモンフリーの MS 培地に移植することにより生育が進み発根

Table 4. Effect of IAA and BA combinations on callus, root, and shoot formation from cotyledon explants of 5 cultivars of cucumber, *C. sativus*.^a

Hormone (mg/l)		Callus, root, and shoot formation ^b				
IAA	BA	Ohgonsokusei	Kagafushinari	Siye	Tokiwajibae	Sharp 1
0.2	0.2	C ₃₀	C ₃₀	nil	nil	C ₁₀
1.0	1.0	C ₁₀₀	C ₁₀₀	C ₈₀	C ₁₀₀	C ₁₀₀
2.5	0.5	C ₁₀₀	C ₁₀₀	C ₁₀₀	C ₁₀₀ , R ₁₀	C ₁₀₀ , R ₁₀
5.0	0.5	C ₁₀₀	C ₁₀₀	C ₁₀₀	C ₁₀₀ , R ₁₀	C ₁₀₀
7.5	0.5	C ₁₀₀ , R ₁₀ , S ₁₀ ^c	C ₁₀₀ , R ₁₀	C ₁₀₀ , S ₁₀	C ₁₀₀	C ₁₀₀ , R ₁₀
10.0	0.5	C ₁₀₀ , S ₁₀	C ₁₀₀	C ₁₀₀	C ₁₀₀ , R ₁₀	C ₁₀₀ , R ₂₀

^a MS medium was used as the basal medium. Cotyledon explants were cultured at 25°C under 16 hr photoperiod for 2 months.

^b C, R, and S indicate callus, root, and shoot, respectively, and the numerals on the side reveal the percentages of formation.

^c Plantlets were induced from shoots by subculture on hormone-free MS medium.

Table 5. Effect of NAA and BA combinations on callus, root, and shoot formation from cotyledon explants of 5 cultivars of cucumber, *C. sativus*.^a

Hormone (mg/l)		Callus, root, and shoot formation ^b				
NAA	BA	Ohgonsokusei	Kagafushinari	Siye	Tokiwajibae	Sharp 1
0.5	0.1	C ₁₀₀ , R ₉₀ , S ₃₀ ^c	C ₁₀₀ , R ₇₀ , S ₁₀	C ₁₀₀ , R ₆₀	C ₁₀₀ , R ₆₀	C ₁₀₀ , R ₁₀₀
0.5	0.5	C ₁₀₀ , R ₃	C ₁₀₀ , R ₄₀	C ₁₀₀ , R ₂₀	C ₁₀₀ , R ₃₀ , S ₂₀	C ₁₀₀ , R ₁₀ , S ₁₀
1.0	0.1	C ₁₀₀ , R ₉₀ , S ₁₀	C ₁₀₀ , R ₉₀	C ₁₀₀ , R ₇₀ , S ₁₀	C ₁₀₀ , R ₇₀	C ₁₀₀ , R ₉₀
1.0	0.5	C ₁₀₀ , R ₆₀	C ₁₀₀ , R ₅₀ , S ₂₀	C ₁₀₀ , R ₅₀	C ₁₀₀ , R ₅₀ , S ₂₀ ^c	C ₁₀₀ , R ₆₄ , S ₅
1.0	1.0	C ₁₀₀ , R ₄₀	C ₁₀₀ , R ₄₀	C ₁₀₀ , R ₃₀	C ₁₀₀ , R ₂₀	C ₁₀₀ , R ₂₀

^a MS medium was used as the basal medium. Cotyledon explants were cultured at 25°C under 16 hr photoperiod for 2 months.

^b C, R, and S indicate callus, root, and shoot, respectively, and the numerals on the side reveal the percentages of formation.

^c Plantlets were induced from shoot by subculture on hormone-free MS medium.

して植物体が得られた品種は、王金促成とときわ地這であった (Table 5)。

IAA+BA の組合せ (Table 4), NAA+BA の組合せ (Table 5) で不定芽形成を比較すると、NAA+BA では供試 5 品種すべてで不定芽形成が認められたのに対し、IAA+BA では 2 品種のみであった。両方のホルモンの組合せを用い不定芽形成が認められた品種は、王金促成と四葉であり、再生植物体が得られた品種は王金促成のみであった。

4. 考 察

子葉からのカルス形成は、ホルモンの組合せにより影響を受けた。オーキシンを IAA と NAA で比較すると NAA ではサイトカイニン無添加では高いカルス形成率が得られたが、IAA ではサイトカイニンを添加しなければ高いカルス形成率は得られなかった。サイトカイニンを BA と Kinetin で比較すると、BA ではオーキ

シン無添加でもカルス形成が認められたが、Kinetin ではサイトカイニン活性は低く、高濃度添加をしなければカルス化が起きなかった。したがって、カルス形成に適したホルモンの組合せは NAA+BA であると考えられた。

不定芽形成のホルモン条件は、王金促成では IAA+BA と NAA+BA で形成が認められたが、IAA+Kinetin ではまったく形成されなく、サイトカイニンとして Kinetin は子葉からの不定芽形成に適さないと考えられた。しかし、これまでに子葉のプロトプラスト培養⁷ や腋芽培養⁸ で IAA+Kinetin および NAA+Kinetin の組合せを用い、植物体再生が報告されており、培養方法や部位により適するホルモンが著しく異なると考えられる。また、キュウリでの植物体再生系では不定胚経由の培養系⁹⁻¹¹ が報告されているが、本研究では IAA+BA, NAA+BA とも不定胚の形成は認められ

なかった。

キュウリにおける IAA+BA を用いた子葉組織からの植物体再生の報告はこれまでにない。この組合せを行うと不定芽形成に特徴的な反応を示し、IAA が高濃度のときはカルス上に不定芽が形成され、一方 IAA が低濃度のときは外植体の切断面から直接不定芽が形成された。すなわち、オーキシンとサイトカイニンのバランスの相違が、不定芽形成過程に影響することが認められた。

不定芽形成のホルモン条件を品種間で比較すると、いずれの品種とも NAA+BA で多くの不定芽形成が認められたが、その濃度条件は品種により異なった。したがって、NAA+BA のホルモン条件は適用品種の範囲が広く、キュウリのカルス培養、不定芽形成に適するものと考えられる。

植物体再生能に品種間差異があることは、トマトのカルス培養^{12,13)} やナスのプロトプラスト培養¹⁴⁾ などで認められている。キュウリにおいては、Kim *et al.*¹⁵⁾ は 2,4-D+BA で子葉組織からカルスを誘導し、NAA+BA で植物体再生を図る培養系で、植物体再生能についての品種間差異を認めている。また、Wehner and Locy¹⁶⁾ も NAA+BA で子葉組織からカルスを経由した植物体再生系で、品種間差異を報告している。これまでの報告では 1 種類の培養系を用いて植物体再生能の品種間差異を比較しているが、本研究では IAA+BA と NAA+BA でそれぞれ 6 および 7 種の濃度組合せで検討したところ、最適ホルモン条件は品種により異なり、さらに植物体再生能に品種間差異あることが明らかとなった。本研究で供試した品種の中では王金促成は IAA+BA と NAA+BA の両方の組合せで不定芽形成が認められ、不定芽からの植物体再生も認められたこと

から、植物体再生能が高い品種と考えられる。

文 献

- 1) Behnke, M., 1979. *Theor. Appl. Genet.*, **55**: 69-71.
- 2) Behnke, M., 1980. *Theor. Appl. Genet.*, **56**: 151-152.
- 3) Thanutong, P., I. Furusawa, M. Yamamoto, 1983. *Theor. Appl. Genet.*, **66**: 209-215.
- 4) Brettell, R. I. S., E. Thomas, 1980. *Theor. Appl. Genet.*, **58**: 55-58
- 5) Gegenbach, B. G., C. E. Green, C. M. Donovan, 1977. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 5113-5117.
- 6) Murashige, T., F. Skoog, 1962. *Physiol. Plant.*, **15**: 473-497.
- 7) Jia, S. R., Y. Y. Fu, Y. Lin, 1986. *J. Plant Physiol.*, **124**: 393-398.
- 8) Handley, L. W., O. L. Chambliss, 1979. *HortScience*, **14**: 22-23.
- 9) Ziv, M., G. Gadasi, 1986. *Plant Sci.*, **47**: 115-122.
- 10) Chee, P. P., D. M. Tricoli, 1988. *Plant Cell Rep.*, **7**: 274-277.
- 11) Bergervoet, J. H. W., F. Van der Mark, J. B. M. Custers, 1989. *Plant Cell Rep.* **8**: 116-119.
- 12) Behki, R. M., S. M. Lesley, 1976. *Can. J. Bot.*, **54**: 2409-2414.
- 13) 豊田秀吉, 清水邦彦, 宋 英凱, 大内成志, 1987. 植物組織培養, **4**: 41-42.
- 14) Nishio, T., T. Sato, K. Takayanagi, 1987. *Jpn. J. Breed.*, **37**: 389-396.
- 15) Kim, S. G., J. R. Chang, H. C. Cha, K. W. Lee, 1988. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, **12**: 67-74.
- 16) Wehner, T. C., R. D. Locy, 1981. *HortScience*, **16**: 759-760.

Summary

Callus Formation and Plant Regeneration from Cotyledon Explant of Cucumber (*Cucumis sativus* L.)

Kohji KAGEYAMA,* Kazunori YABE and Shigetoshi MIYAJIMA

Aichi-ken Agricultural Research Center, Nagakute, Aichi, 480-11

* Present address: Faculty of Agriculture, Gifu University, Yanagido, Gifu, 501-11

Cotyledon explants of cucumber, 'Ohgonsokusei,' were cultured on MS medium containing various hormone combinations: IAA and Kinetin, IAA and BA, and NAA and BA. Calli were formed in the medium with a wide range of the hormone concentrations of IAA and BA, and NAA and BA. In the low concentration of IAA, shoots were formed around the cut end of the explants, while in the high concentrations of IAA they formed in the callus. In the medium containing NAA and BA, shoots were formed in the callus by the addition of 0.1~1 mg/l NAA and 0.5 mg/l BA. When shoots were subcultured on hormone-free MS medium, shoots regenerated to plants.

When cotyledon explants of 5 varieties were cultured, no differences in the ability of callus formation were found, but the ability of plant regeneration depended on varieties. 'Ohgonsokusei' exhibited the most desirable ability of plant regeneration.