

メロン葉外植片からのカルス誘導とその植物体再生

豊田秀吉*・茶谷和行*・清水邦彦*・前田和彦**・
竹林晃男**・宋 英凱*・大内成志*

* 近畿大学農学部
(〒577 東大阪市小若江3-4-1)
** 近畿大学附属湯浅農場
(〒643 和歌山県有田郡湯浅町)

(1986年9月19日受付)

(1986年11月12日受理)

メロン苗の若い葉から得た外植片を IAA とカイネチンを含む MS 培地で培養し、カルス誘導とその再生条件を検討したところ、80種のホルモン濃度区のうち、16種の組合せ濃度区で再生体を得られ、そのうち3種の濃度区については、2,4-D・カイネチンで誘導したカルスからも再生体を得ることができた。得られた再生植物は通常の栽培環境において順調に生育し、花芽形成に止まらず、交配による種子生産も可能であった。これらの結果は、メロン品種春系3号と冬系4号の F₁ 個体を用いて得られたものであるが、ここで検討した再生条件のいずれかが、同一品種であれば親系統の異なる諸種雑種個体の再生に適用できることが明らかになった。

1. 緒言

組織培養技術の植物の品種改良への応用については、多くの基礎的研究が進められてきており¹⁻³⁾、筆者らも、これまでそのような手法を応用し、病害抵抗性^{4,5)}やウイルスフリー化⁶⁾、あるいは薬剤耐性植物の育成⁷⁾について検討してきた。近年、メロンの栽培面積は次第に増加しているが、その病害、特に土壌病害に対して有効な抵抗性品種が育成されておらず⁸⁾、栽培上重要な課題となっている。そこで筆者らは、培養細胞の変異性に着目し、体細胞変異 (Somaclonal variations) を利用した耐病性メロン育成に関する研究を開始することとした。しかしながら、メロンについては、これまで培養細胞から植物体再生に成功した例がほとんどないので⁹⁾、まず耐病性系統育成の基礎研究として、植物体再生に関わる諸条件を明らかにすることとした。その結果、メロン葉から誘導したカルス組織から効率よく再生植物体を得る条件が判明したので、ここにその詳細について報告することとする。

2. 材料および方法

本実験には、主としてメロン (*Cucumis melo*, L. 品種

Earl's Favourite) の春系3号と冬系4号を交配した F₁ 雑種個体を用いた。播種後約40日間ガラス室内で栽培し、6~8枚の本葉が展開したメロン苗の上位2葉を試した。水洗後、採取した葉を70%エタノールに3分間、Tween 20 を数滴加えた2%次亜塩素酸ナトリウムに5分間浸漬し、滅菌水で数回洗浄したのち、1~1.5 cm² の葉断片を作製して葉外植片とした。葉外植片の培養には、2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) あるいは indole-3-acetic acid (IAA) とカイネチンを添加した Murashige-Skoog¹⁰⁾(MS) 培地 (pH 5.6, 寒天濃度 0.8%) を用いた。培地 40ml を入れた直径 9cm, 高さ 15cm の円筒状ガラス容器に5外植片ずつ置床し、各試験区合計25外植片について、植物ホルモンの種類や濃度がカルス誘導や形態形成に及ぼす影響について調べた。その他の培養条件としては、温度を 26±1℃, 照度を 3,000~4,000 lux の全日長照明とした。

葉外植片からカルス組織が誘導された場合には、カルス組織のみを切断して同一組成の MS 培地に移植し、以後は3週間周期でそれらを継代した。継代培養期間中にカルス組織から幼苗 (shoot) が形成されたものについては、shoot から2~3枚の小葉が分化し、かつその小葉が十分展開した時点で発根誘導培地に移植した。発根

後、十分に根の伸長が認められたものは、パーミュキュライトのポットに移植し、3～4日間温室で馴化させ、その後ガラス室に定植して花芽形成や果実形成能などについて検討した。

3. 結果および考察

植物体組織からカルスを誘導し、さらにそれらから効率よく植物体を再分化させるためには、用いた植物の種類やその組織に応じて、それぞれに適した培養条件を検討しなければならない¹⁾。通常、植物組織外植片としては根、茎、葉、芽などが用いられているが、本研究ではメロン苗の若い葉を外植片として用いた。葉を外植片とする場合には、少数の植物個体から多数の外植片を作製できる利点があり、多くの植物ホルモン濃度区を設定試験するうえで極めて好都合である。本研究では、培地に添加する植物ホルモンの種類や濃度について多くの組合せを設け、それらがメロン葉外植片からのカルス誘導やカルス組織からの shoot あるいは根の分化・伸長などに及ぼす影響について検討した。

まず、2,4-D とカイネチンの組合せについてその効果を検討した。両植物ホルモンとも培地に添加する濃度を 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 および 2.0 mg/l の 7 濃度区とし、それぞれを組合せた 49 実験区においてメロン葉外植片を培養した。その結果、植物ホルモン無添加区および 2,4-D を 0.05 mg/l、カイネチンを 0.01 mg/l 以下で組合せた 6 実験区を除いたすべての実験区において、外植片置床後 1～3 週間でカルス誘導が観察された。良好なカルス増殖は、2,4-D の濃度を 0.05 から 1.0 mg/l とし、カイネチンを 0.05 mg/l 以上添加した多くの実験区で観察された。先に示した 6 実験区のように、両植物ホルモンを添加しないか、あるいは添加濃度の低い実験区では、葉外植片の周縁部がわずかにカルス化されたものや、外植片から不定根が誘導されたものが観察されたが、後に外植片やカルス組織ともに褐変化し、以後の増殖は認められなかった。カルス組織からの根の分化は、2,4-D 濃度を高くし (1.0 mg/l 以上)、カイネチンを 0.05 mg/l 以下の濃度にした実験区で観察されたが、その伸長は不十分であって、培養を継続してもほとんどのものは伸長しなかった。一方、両ホルモンともに 0.05 から 0.5 mg/l の濃度で組合せた実験区においては、置床 30～60 日後にカルス組織から緑色小斑 (greening spot) が形成されるものも存在したが (2,4-D とカイネチンをそれぞれ、0.05 と 0.05, 0.05 と 0.1, 0.1 と 0.1, 0.1 と 0.5 および 0.5 と 0.5 mg/l とした実験区)、そのようなカルスをその後 30 日間同一ホルモン組成の培地で継代しても、小斑部から shoot などの分化は

認められず、また、小斑部の緑色が白化するものも出現した。

以上の結果から、2,4-D・カイネチン培地ではメロン葉外植片から増殖良好なカルス組織を得ることはできても、カルスから植物体を再分化させることはできないと考えられた。そこで、2,4-D を IAA に置き換えた IAA・カイネチン培地を用い、葉外植片および 2,4-D・カイネチン培地で誘導したカルス組織の培養を試みた。まず、IAA・カイネチンについても先の 2,4-D・カイネチンの場合と同じ濃度区を設け、その培地で葉外植片を培養したところ、IAA を 0.01 または 0.05 mg/l とし、カイネチンを 2.0 mg/l とした実験区において shoot の形成が確認された。そこで、shoot 形成に及ぼす両ホルモンの濃度効果をさらに詳しく検討するため、IAA を 0.01 から 0.1 mg/l の 10 段階、カイネチンを 0.5, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.3, 1.5 および 2.0 mg/l の 8 段階として、両者を組合せた合計 80 とおりの実験区を設け、葉外植片の培養を行った (Table 1)。この場合にも葉外植片のカルス化は、その周縁部から起こるが、それに要する平均日数は短いもので 4.5 日 (0.05 mg/l IAA と 0.8 mg/l カイネチン添加区)、長いもので 30.5 日 (0.06 mg/l IAA と 0.6 mg/l カイネチン添加区) であった。また、IAA とカイネチンを用いた場合には、多くの実験区において良好なカルス増殖を示し (Fig. 1-A)、2,4-D・カイネチン培地でみられたカルス組織の褐変化は観察されなかった。外植片上面全体がカルス組織で覆われたものについては、カルス組織のみを同一培地に移植したが、多くの実験区では移植前 (外植片置床後 30 日以内) にすでに緑色小斑が形成されていた。このように、緑色小斑の形成された実験区では、小斑形成後 4～16 日経過して shoot の分化が認められた (Table 2)。さらに、カルス組織が緑色小斑や shoot を形成する能力は、そのカルス組織を数世代同一培地で継代した後も失われることはなかった。このように、カルス組織から緑色小斑や shoot を分化させることに成功したが、多数の緑色小斑を含むカルスをそのまま培養した場合には、そこから多数の shoot が密生するため、それぞれの生育が不十分となり、枯死するものも多く出現した。そこで、生育良好な再生植物体を得るため、各カルスを一個の緑色小斑が含まれるようなカルス塊 (直径 0.5～1 cm) に切断して移植・培養した (Fig. 1-B)。その結果、Fig. 1-C に示すように、移植後約 10 日で小斑部から生育良好な shoot の形成が認められ、小葉の分化も観察された。つぎに、小葉が十分に展開したものをホルモン無添加 MS 培地に移植したところ、移植後 7～10 日で根が分化し、その後も順調に

Table 1. Effect of indole-3-acetic acid and kinetin^a on regeneration^b of leaf-explants of melon, *C. melo*, cv. Earl's Favourite.

Concentrations (mg/l) of kinetin	Concentrations (mg/l) of IAA									
	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.10
0.5	C _{15.5}	C _{5.7}	C ₁₄	C _{10.3}	C ₁₀ *	C ₉ *	C _{10.6}	C ₁₁	C ₁₀	C ₉ *
0.6	C _{13.5}	C ₁₃	C _{6.8} *	C ₁₁ -gs-s	C ₇ *	C _{30.5}	C ₈ *	C ₁₃	C _{11.5}	C ₂₁
0.8	C ₁₂	C ₁₂	C ₉ *-gs-s	C ₁₁ -gs-s	C _{4.5} *	C ₁₁ *	C ₁₄	C ₆ *	C _{9.5} *	C ₁₂
1.0	C _{13.3}	C ₁₃	C ₁₁ -gs-s	C ₉ *	C ₁₄	C ₁₀	C ₁₄	C _{14.7}	C ₁₀	C ₁₃
1.2	C ₁₃ -gs-s	C _{11.8}	C ₉ *-gs-s	C _{22.5}	C ₁₀ -gs-s	C ₉ *-gs-s	C ₁₄	C ₆ *	C ₆ *	C ₁₈
1.3	C ₁₄	C ₁₂ *-gs-s	C ₆ *-gs-s	C _{8.5}	C _{13.5}	C ₁₈ *	C ₆ *	C _{13.3}	C ₁₄	C ₁₄
1.5	C ₁₀ -gs-s	C ₁₅ -gs-s	C _{10.2}	C _{21.5}	C ₁₀	C ₅ -gs-s	C _{15.5}	C ₉ *	C ₁₁	C ₁₅
2.0	C ₁₀ -gs-s	C _{7.5}	C ₁₂ -gs-s	C ₁₄	C ₁₁ -gs-s	C ₁₂	C ₁₂	C ₁₂ *	C _{11.5} *	C ₉ *

^a Various concentrations of indole-3-acetic acid (IAA) and kinetin were added to Murashige-Skoog medium (pH 5.6, 0.8% agar). Leaf-explants were incubated at 26 °C under a constant illumination of 3,000-4,000 lux.

^b Actively growing calluses (C*), greening spots (gs) and shoots (s) were induced from explant-derived callus tissues (C) of melon.

Numbers represent days for callus induction. Days required for greening spot- and shoot-initiation are shown in **Table 2**.

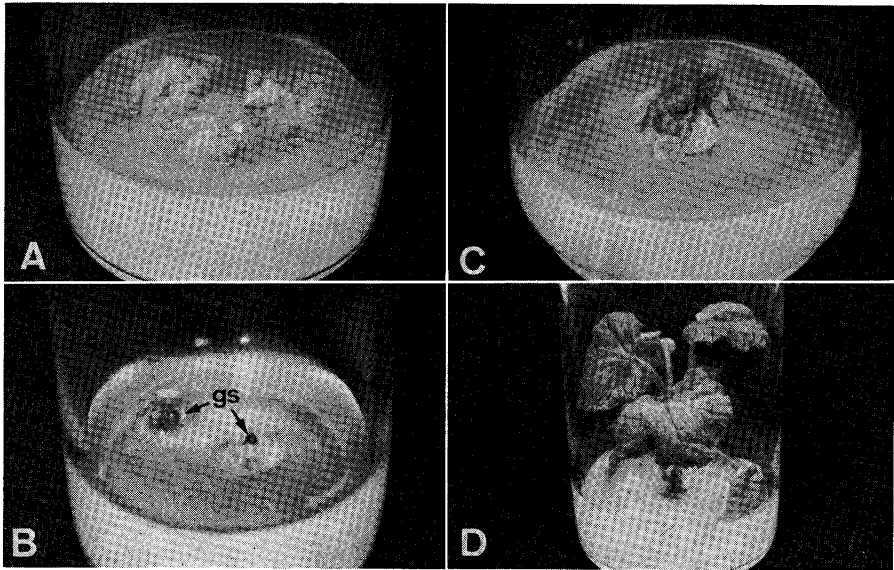


Fig. 1. Plant regeneration of callus tissues induced from leaf-explants of melon, *C. melo*, cv. Earl's Favourite

A) Actively growing callus tissues, 10 days after incubation (0.03 mg/l IAA and 0.8mg/l kinetin). B) Excised callus tissues possessing only one greening spot (gs), 18 days after incubation. C) Shoot development from a greening spot, 24 days after incubation. D) Root development from shoot cultured in hormone-free medium, 35 days after incubation.

伸長した (**Fig. 1-D**).

筆者らはすでにトマト¹²⁾やペピーノ¹³⁾について、葉外植片からの再生条件を確立してきたが、今回はメロンについて、カルス誘導やその増殖、shoot 形成や発根誘導などそれぞれに適した条件を明らかにすることができ

た。特に、shoot 形成に関する結果を **Table 2** にまとめたが、そこに示した shoot 形成に有効な培地を用いて、先の 2,4-D・カイネチンで誘導した緑色小斑形成カルスを培養したところ、約 1 カ月後には IAA とカイネチンをそれぞれ 0.01 と 1.2, 0.01 と 1.5 および 0.04 と

Table 2. Combinations of plant hormone concentrations effective for regeneration of melon.

Callus tissues ^a	Days for initiation of greening spots (left) and shoots (right)															
	0.01 ^b	0.01	0.01	0.02	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.04	0.05	0.05	0.06	0.06
	1.2	1.5	2.0	1.3	1.5	0.8	1.0	1.2	1.3	2.0	0.6	0.8	1.2	2.0	1.2	1.5
Sp 3×W 4	36-42	18-24	13-19	13-18	17-24	16-20	18-23	18-24	19-31	19-23	32-48	17-25	31-40	22-38	13-21	14-23
Su 4×Su 1	14-19	16-27	14-25	17-32	22-29	15-25	—	—	10-20	—	—	—	—	—	—	—
Su 7×Su 1	—	—	—	—	—	—	—	23-28	—	—	—	—	—	19-24	—	—

^a Callus tissues were induced from leaf-explants of F₁ hybrid plants between Haru No. 3 strain (Sp 3) and Fuyu No. 4 (W 4), Natsu No. 4 (Su 4) and Natsu No. 1 (Su 1), and Natsu No. 7 (Su 7) and Natsu No. 1.

^b Concentrations (mg/l) of IAA (upper row) and kinetin (lower row) added to Murashige-Skoog medium.

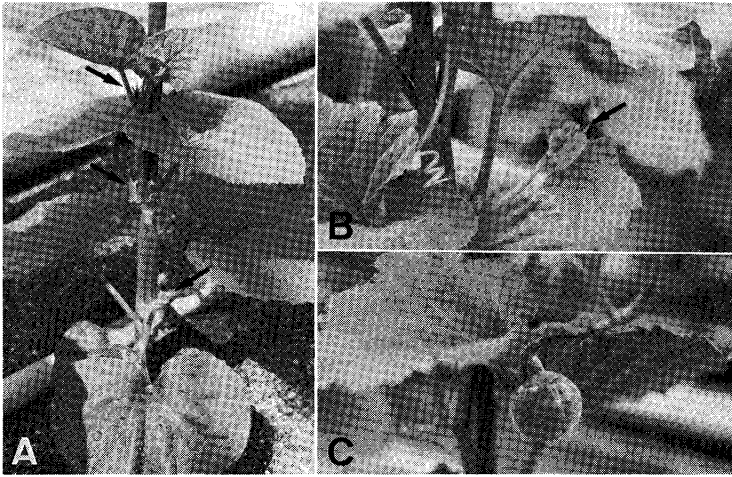


Fig. 2. Developments of regenerated plants under an ordinary green house conditions

A) Formation of male flowers (arrows), 15 days after transplantation to soil. B) Formation of female flower (arrow), 35 days after transplantation. C) Formation of fruit, 42 days after transplantation (7 days after mating).

0.6 mg/l とした培地については、緑色小斑部から shoot の形成が観察された。このことは、緑色小斑形成は、2, 4-D と IAA のいずれをカイネチンと組合せても達成されるが、そこからの shoot 再分化には IAA・カイネチンのみが有効であることを示すものと考えられる。

上述のように、shoot 形成に関しては、IAA・カイネチン培地ではいずれのホルモン区であっても、shoot がいったん形成されると例外なく（培養に要する日数は異なるが）再生植物体を得ることが可能であった。このようなことから、再生植物体を得る上でもっとも重要な要因は shoot 形成の成否であると考えられる。本実験では IAA とカイネチンを組合せた 16 種類のホルモン区に限定して shoot 形成が観察されたが、このような結果の意味するところはなお明らかでない。ただ、先のトマトの場合にも shoot 形成に適した植物ホルモン (IAA と BAP)

組合せ区は 35 種類存在し¹²⁾、現在日本で栽培されているおもなトマト 22 品種について再生条件を検討した結果、そのすべての品種がいずれかのホルモン区で植物体を再分化することが判明している¹⁴⁾。このような結果からすると、その植物のホルモン感性 (hormone response) は種のレベルで定まっているものかもしれない。今回のメロンにおいては、同一品種であってもその親系統の異なる雑種個体、すなわち夏系 4 号×夏系 1 号および夏系 7 号×夏系 1 号から得た F₁ 雑種個体について、その再生条件を検討した。この場合にも、春系 3 号×冬系 4 号の雑種個体について有効であった 16 種類のホルモン区のいずれかが、他の雑種個体についても有効であった (Table 2)。現在、他のメロン品種を用いて同様に再生体を得られるかどうかについて検討しているが、最近、Moreno ら¹⁵⁾ はメロン品種 Amarillo Oro の胚軸や子葉から、や

はり IAA とカイネチンを用いて植物体再生に成功している。これらの結果は、ある品種の葉外植片で求めた複数種の再生体分化ホルモン区が、異なる品種の再生にも適用できる可能性を示唆しており、植物の再生条件を系統的に理解する上で、重要な基礎的知見であると考えられる。

以上のように、メロン葉外植片からカルスを誘導し、そのカルスから植物体を再分化させることはできるが、このような再生植物体が正常に生育し、かつ次代種子を生産できるかどうかは、組織培養技術を植物の品種改良に応用するうえで非常に重要な問題となる。したがって、本実験で得られた春系3号×冬系4号の雑種再生植物体について、それを通常のガラス温室に定植（本葉6枚）し、その後の生育を観察することとした。その結果、再生体は定植後も順調な生育を続け、定植15日後までに17枚の本葉を展開し、かつ雄花を分化した（Fig. 2-A）。さらに、定植7～31日後までに、13節から29節までの各葉柄基部に雌花の着成を確認したので（Fig. 2-B）、このうち13から15節位の雌花に、同一個体の雄花から得た花粉を交配した。その結果、交配7日後には13節位の雌花で順調な果実の肥大が認められたので、他を摘果し、その発育を促進させた。今回の再生体から得た果実は、Fig. 2-C に示すように若干丸味をおびていたが、その後の果実の発育は良好に推移し、約250粒の完全種子を得ることができた。今後は、再生植物の次代植物を使用し、それらがどのような変異を有しているかについて、その遺伝学的・栽培学的諸性質を検討するとともに、耐病性のみならず、その他の諸形質に対しても優良な個体

を選抜する予定である。

文 献

- 1) Carlson, P. S., J. C. Polacco, 1975. *Science*, **188**: 622-625.
- 2) Bretell, R. I. S., D. S. Ingram, 1979. *Biol. Rev.*, **54**: 329-345.
- 3) Larkin, P. J., W. R. Scowcroft, 1981. *Theor. Appl. Genet.*, **60**: 197-214.
- 4) 豊田秀吉, 1986. *組織培養*, **12**: 119-123.
- 5) 豊田秀吉, 茶谷和行, 清水邦彦, 大内成志, 1986. *日植病報*, **52**: 503.
- 6) Toyoda, H., Y. Oishi, Y. Matsuda, K. Chatani, T. Hirai, 1985. *Phytopath. Z.*, **114**: 126-133.
- 7) 豊田秀吉, 武藤隆繁, 内海龍太郎, 平井篤造, 1985. *近畿大農紀要*, **18**: 9-13.
- 8) 篠原 潔, 1975. *農業および園芸*, **50**: 893-897.
- 9) Flick, C. E., D. A. Evans, W. R. Sharp, 1983. In "Handbook of Plant Cell Culture" (ed. by Evans, D. A., et al.), Vol. 3, p. 13-81, Macmillan Publishing, New York.
- 10) Murashige, T., F. Skoog, 1962. *Physiol. Plant.*, **15**: 473-497.
- 11) 竹内正幸, 1973. *植物組織培養* (竹内正幸ほか編), p. 195-225, 朝倉書店, 東京.
- 12) 豊田秀吉, 大形 浩, 松田克礼, 茶谷和行, 平井篤造, 1985. *植物組織培養*, **2**: 70-73.
- 13) 豊田秀吉, 庄司竜三, 茶谷和行, 北 宜裕, 1986. *植物組織培養*, **3**: 89-91.
- 14) 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.
- 15) Moreno, V., M. Garcia-Sogo, I. Granell, B. Garcia-Sogo, L. A. Roig, 1985. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, **5**: 139-146.

Summary

Breeding of Disease Resistant Netted Melon by Tissue Culture System (I) Callus Induction and Plant Regeneration from Leaf-Explants of Melon (*Cucumis melo*, *L. reticulatus* group)

Hideyoshi TOYODA*, Kazuyuki CHATANI*, Kunihiro SHIMIZU*, Kazuhiko MAEDA**,
Teruo TAKEBAYASHI**, Eikei SO* and Seiji OUCHI*

* *Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kinki University,
Kowakae 3-4-1, Higashiosaka 577, Japan*

** *Experimental Farm, Kinki University, Yuasa, Wakayama 643, Japan*

Hormonal balance required for plant regeneration was studied with leaf-explants of *Cucumis melo*, cv. Earl's Favourite. Shoots were induced from explant-derived callus tissues in the media containing various concentrations of IAA and kinetin, but not of 2,4-D and kinetin. Some of these media (IAA and kinetin) were effective for regenerating shoots from callus tissues induced by 2,4-D and kinetin. Roots were developed in culturing shoots in hormone-free medium. Regenerated plants successfully grew and produced self-pollinated mature seeds under ordinary green house conditions.