

メロンの子葉プロトプラストからの植物体再分化

山中寿子・天笠一美・吉田 裕

大和農園

(〒632 天理市平等坊町)

(1990年2月6日受付)

(1990年4月9日受理)

メロンの子葉からプロトプラストを単離し、培養条件および再分化条件について検討した。播種7日目の展開子葉を酵素液(0.05% ペクトリアーゼ Y-23, 1.0% セルラーゼオノズカ RS)で16時間静置処理してプロトプラストを単離した。得られたプロトプラストを種々のホルモンを含む1/2 MS 培地を用い、25°C、暗黒下で培養した。プロトプラストの分裂およびコロニー形成にはオーキシンとしては NAA 0.5 mg/l が、サイトカニンとしては zeatin 1.0 mg/l が効果的であった。プロトプラスト培養開始3週間後に1~2mm 大に生育したコロニーを再分化培地に移植したところ、3週間後に不定芽が分化した。再分化培地のサイトカニンとしては BA 0.5 mg/l が適していた。またショ糖濃度は3%が必要であり、支持体には0.8% 寒天よりも0.2% gellan gum (Gelrite®) が良好であった。再分化した不定芽を同培地に移植を繰り返し、次いで BA 0.2 mg/l に移植した。その後 IAA 0.2 mg/l + GA₃ 0.05 mg/l 添加培地に移植することによりシュートが伸長し、発根し、馴化個体を得ることができた。

1. 緒言

近年、多くの植物種においてプロトプラストからの植物体再生が報告されている。しかしながらプロトプラストからの安定した再分化系が得られている植物はまだ限られている。細胞融合による育種素材の作出のためには、対象とする作物のプロトプラスト再分化系を確立することが必要である。メロンにおいては葉肉プロトプラストからカルス形成¹⁾、子葉プロトプラストからの不定根分化²⁾、子葉プロトプラストからの不定芽分化³⁻⁵⁾の報告があるが馴化可能な植物体は得られていない。

本研究ではメロンの子葉プロトプラストの培養条件について検討し、安定して完全な植物体を再生させることが可能な培養法が確立できたのでここに報告する。

2. 材料および方法

材料としてアールス系 'C-1' (大和農園育成系統)を用いた。種子を種皮除去後、ウィルソン液(さらし粉10gを140mlの蒸留水に5分間攪はんした後30分静置後の濾液)に30分浸漬し殺菌した。滅菌水で3回すすいだ後無菌播種用寒天培地に播種し、25°C、16時間日長、4,000 lux で育苗し、約7日目の展開子葉を材料とした。

子葉を1~2mm幅に細断し、酵素液に浸漬し、28°C、16時間、暗黒下で静置した。酵素液は0.05% ペクトリアーゼ Y-23, 1% セルラーゼオノズカ RS³⁾ に0.4M マ

ンニトール、0.1% CaCl₂·2H₂O、グリシンを0.1M⁶⁾を添加し、pH 5.5 に調整したものをを用いた。酵素処理後、得られたプロトプラストを50μmのナイロンメッシュで濾過し、700 rpm、3分遠心分離し、0.1% 塩化カルシウムを含む0.5M マンニトールで2回洗浄した。

得られたプロトプラストを1/2濃度の Murashige & Skoog 培地⁷⁾に1% ショ糖、0.3M マンニトールを加え、オーキシンとサイトカニンを組み合わせ、pH 5.8 とし、0.09% Gelrite を加えた固形培地で培養した。プロトプラストの密度は1×10⁶/ml とし25°C、暗黒下で静置した。

プロトプラスト培養開始2週間後にマンニトールの濃度を低く調整した培地を等量添加し、浸透圧を下げた。3週間後、1~2mmに発達したコロニーを種々の濃度のホルモンを含むMS寒天培地(ショ糖3%、寒天8g/l)に移植し莖葉の再分化を促した。移植後は25°C、3,000 lux、16時間日長下で培養した。再分化率の向上と正常な不定芽誘導のための諸要因についても検討した。MSにBA 0.5 mg/l 添加した培地を基本とし、ショ糖濃度は1%、3%、pHは5.0、5.8(120°C、10分のオートクレーブ前に調整)、支持体は寒天0.8%、Gelrite 0.2% を組み合わせて用いた。

3. 結果および考察

(1) メロンプロトプラストの分裂とコロニー形成

プロトプラスト培養開始4日目頃から1回目の細胞分裂が見られた(第1図)。プロトプラストの培養開始から10日目に細胞分裂の頻度の調査を行い、植物ホルモンの種類および濃度との関係を検討した。本実験では全区で分裂が見られたが、NAA 0.5 mg/l+BA 0.5~1.0 mg/l, NAA 0.2~0.5 mg/l+zeatin 0.1~1.0 mg/l, NAA 0.5 mg/l+IAA 0.2 mg/l+BA 0.5 mg/l または zeatin 1.0 mg/l の培地で30%と高い分裂率が得られた。高い分裂率が得られた培地はいずれもオーキシンとして NAA 0.5 mg/l 程度が含まれており、サイトカイニンの種類、濃度に関わらず NAA 0.5 mg/l がメロンプロトプラストの細胞分裂に効果的であると考えられた。

培養3週間後に径1~2mmのコロニーが形成された。培養4週間後に、1シャーレ当りのコロニー形成数の調査を行い、植物ホルモンの種類および濃度との関係を検討した(第1表)。2,4-D 0.5 mg/l, NAA 1.0 mg/l 以上のオーキシン高濃度区の培地ではコロニーが形成されなかった。NAA 0.2~0.5 mg/l+BA 0.1~1.0 mg/l, NAA 0.5 mg/l+zeatin 0.5~1.0 mg/l, IAA 0.2~0.5 mg/l+BA 0.5 mg/l, NAA 0.2~0.5 mg/l+IAA 0.2 mg/l+BA 0.5 mg/l または zeatin 1.0 mg/l の培地で多くのコロニーが形成された。中でも NAA 0.5 mg/l+zeatin 1.0 mg/l では1シャーレ当り200個以上のコロニーが得られた。これらの区では NAA, IAA が各々 0.2~0.5 mg/l 含まれており、初期の細胞分裂に効

果的であった NAA 0.5 mg/l がコロニー形成にも効果的であった。細胞分裂とコロニー形成を通じて、オーキシンとしては NAA 0.5 mg/l, サイトカイニンには zeatin 1.0 mg/l を添加した培地が適していると考えられる。

これまで報告されたメロンプロトプラスト培養系において用いられた初期培養培地のオーキシンは、Moreno ら¹⁾, Roig ら⁴⁾では NAA 0.5 mg/l+2,4-D 1.0 mg/l, 大塚ら³⁾では NAA 2.0 mg/l であり、オーキシン濃度が高い。田部井ら⁵⁾は 2,4-D 0.05 mg/l, Matsumoto ら²⁾は NAA 0.5 mg/l を用いており低濃度となっている。本試験でも高濃度のオーキシンは分裂およびコロニー形成には阻害的であり、低濃度が良好であった。初期培養培地のオーキシンの種類としては、ノーネット系‘シャランテ’を材料とした Moreno ら¹⁾, Roig ら⁴⁾, 田部井ら⁵⁾は 2,4-D を添加した培地を用いているのに対し、アールス系を材料とした大塚ら³⁾, Matsumoto ら²⁾は NAA を添加した培地を用いている。アールス系を材料とした本実験でも NAA が 2,4-D 添加よりも、分裂およびコロニー形成に効果的であり、適するオーキシンの種類に品種間差があることが考えられる。

(2) コロニーの移植と不定芽の誘導

3週間後に形成された1~2mmのコロニーを再分化培地に移植した。再分化培地は IAA (0.02, 0.2 mg/l), BA (0.05, 0.5, 2.0, 5.0 mg/l), zeatin (0.5 mg/l), kinetin (1.0 mg/l) を組み合わせて添加した培地を

Table 1. Effect of 2,4-D, NAA, IAA, BA and zeatin on cell colony formation of melon protoplast.

2,4-D	NAA (mg/l)	IAA	BA (mg/l)			Zeatin (mg/l)		
			0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0
0.05				+	+			
0.5			-	-				
0.05		0.2		+				
	0.2		++	++	++	±		±
	0.5		++	++	++	±	++	+++
	1.0		±	-		±	±	
	2.0							-
		0.2		++				
		0.5		++				
	0.2	0.2		+				++
	0.5	0.2		++				++

Protoplasts were cultured in the medium of 1/2 MS salt (1% sucrose, 0.3 M mannitol, 0.09% Gelrite, pH 5.8).

Number of colonies obtained from 10⁵ protoplasts was counted four weeks after culture.

- = 0, ± = 0~20, + = 20~50, ++ = 50~200, +++ = >200/plate.

用いた。また GA_3 (0.5 mg/l), ABA (0.5, 2.0 mg/l) も組み合わせて検討した。これはメロン葉片からの再分化の報告⁸⁾, メロンプロトプラストからの再分化の報告^{3,5)}, および子葉からの不定芽を誘導した予備実験を基に組み合わせたものである。移植後1週間でカルスが増殖し, 約2週間でグリーンスポットが形成され, 3週間後膨潤化した不定芽が分化した (第1図)。BA

0.5 mg/l 単用, BA 0.5 mg/l+zeatin 0.5 mg/l, BA 0.05 mg/l+kinetin 1.0 mg/l の培地で移植したカルスの30% から不定芽が分化した。IAA 添加培地はグリーンスポットが形成されたがカルス化した。BA 0.5 mg/l + GA_3 0.5 mg/l, BA 0.5 mg/l+ABA 0.5 mg/l の区では低率であるが不定芽が分化した。BA 2.0, 5.0 mg/l といった高濃度添加培地では不定芽の分化が見られな

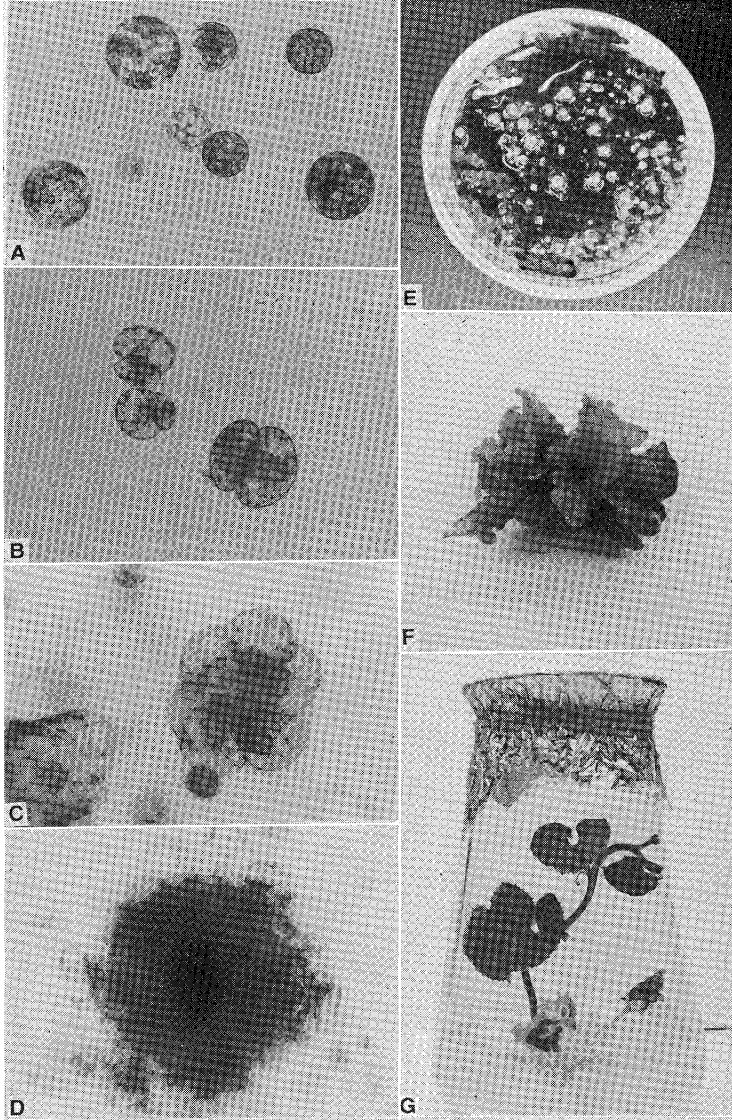


Fig. 1. (A) Protoplasts isolated from cotyledons of melon. (B) First cell division of melon protoplasts (4 days after isolation). (C) Cell division of melon protoplasts (1 week after isolation). (D, E) Cell colony of melon protoplasts (3 weeks after isolation). (F) Shoot buds regeneration from callus of melon protoplasts (1.5 months after isolation). (G) Shoot elongation and root formation (5 months after isolation).

った。メロン胚軸由来カルスから不定芽を誘導する場合、GA₃、ABA は不定芽の膨潤化などの奇形葉の正常化に効果的であると Kathal ら⁹⁾が報告している。しかし本実験では正常化は見られず、再分化率も低下した。これらのことから不定芽の分化にはサイトカイニンのみの添加が有効であり、中でも 0.5 mg/l といった低濃度 BA が効果的であると考えられる。

再分化率の向上と正常な不定芽誘導のためにシヨ糖濃度、pH、支持体の影響について検討した(第2表)。シヨ糖 1% では pH、支持体に関わらず不定芽の分化が見られず、シヨ糖は再分化には 3% が必要であった。pHは 5.0 よりも 5.8 の培地で再分化率が高かった。支持体として Gelrite を用いた培地が寒天培地よりも再分化率が高かった。寒天培地で分化した不定芽はカルス化したり移植時期が遅れると褐変化を起こしやすいが Gelrite を用いた培地で分化した不定芽は良好に発育した。以上のことから再分化には支持体として Gelrite を使い、シヨ糖 3%、pH を 5.8 とした培地が適当と考えられる。

再分化した不定芽を BA 0.5 mg/l 添加培地に移植を数回繰り返した後、BA 0.2 mg/l に継代し、2 cm 程度に伸長した不定芽を IAA 0.2 mg/l + GA₃ 0.05 mg/l 添加培地に移植を行ったところ茎が伸長し、発根も見られ、その後完全な植物体を得ることができた(第1図)。なお不定芽形成までにプロトプラスト単離から 1.5 カ

月、完全に植物体形成までにプロトプラスト単離から 3 カ月要した。

大塚ら³⁾は IAA 0.2 mg/l + BA 2.0 mg/l、田部井ら⁵⁾は BA 2.0 mg/l + GA₃ 0.5 mg/l を用い再分化を行っているが、本研究では BA 0.5 mg/l といった低濃度を用いている。従来再分化した不定芽が伸長困難であったのはサイトカイニン過剰障害が一因と考えられるが、低濃度の BA の使用により不定芽の伸長が容易になった。従来の報告では再分化までに数カ月要していたが、低濃度のサイトカイニンの使用と Gelrite の使用により 1.5 カ月という短期間で不定芽を得ることができた。またこれまでの報告では不定芽からの発根に留まっていたが本研究では順化可能な植物体を得ることができた。

以上メロンプロトプラストからの植物体再生系を確立した。現在、この培養系を用いてメロンに耐病虫性を導入するためにメロン近縁野生種との体細胞融合を試みている。

本研究は農林水産業・食品産業等バイオテクノロジー先端技術開発補助事業「種苗産業におけるニュー・ハイブリッド育成システム」により実施したものである。本研究を実施するに当たって、ご指導ならびにご校閲を賜りました野菜茶業試験場野菜育種部 西尾剛主任研究官に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) Moreno, V., L. Zubeldia, L. A. Roig, 1984. *Plant Sci. Lett.*, **34**: 195-201.
- 2) Matsumoto, S., I. Takebe, 1987. *Plant Tissue Cult. Lett.*, **4**: 18-21.
- 3) 大塚寿夫, 末松信彦, 戸田幹彦, 1986. 育種, **36** (別冊 1): 74-75.
- 4) Roig, L. A., L. Zubeldia, M. C. Orts, M. V. Roche, V. Moreno, 1986. *CGC.*, **9**: 74-76.
- 5) 田部井豊, 菅野細雄, 五十嵐勇, 西尾 剛, 1987. 園学要旨, 昭 62 秋, p. 236-237.
- 6) Orezyk, W., S. Malepszy, 1985. *Plant Cell Rep.*, **4**: 269-273.
- 7) Murashige, T., F. Skoog, 1962. *Physiol. Plant.*, **15**: 473-497.
- 8) 末松信彦, 大塚寿夫, 戸田幹彦, 1986. 育種, **36** (別冊 1): 22-23.
- 9) Kathal, R., S. P. Bhatnagar, S. Bhojwani, 1986. *J. Plant Physiol.*, **126**: 59-62.

Table 2. Effect of sucrose concentration, pH and gelling agent on shoot regeneration from calli of melon.^a

Sucrose (%)	pH ^b	Gelling agent ^c	No. of colony transferred	Calluse with shoot (%)
1	5.0	agar	6	0
1	5.0	Gelrite	6	0
1	5.8	agar	6	0
1	5.8	Gelrite	6	0
3	5.0	agar	12	8
3	5.0	Gelrite	12	25
3	5.8	agar	12	25
3	5.8	Gelrite	16	44

^a MS medium (0.5 mg/l BA) was used.

^b pH was adjusted with NaOH before autocraving.

^c 0.2% Gelrite or 0.8% agar was used.

Summary

Plant Regeneration from Cotyledon Protoplast of *Cucumis melo* L.

Hisako YAMANAKA, Kazumi AMAGASA and Hiroshi YOSHIDA

Yamato Noen Co. Ltd., 110 Byodoubou, Tenri, Nara 632, Japan

Suitable media for protoplast culture and plant regeneration from cotyledon protoplast were examined in melon (*Cucumis melo* L.), c. v. 'C-1.' Protoplast were isolated by incubating leaf slices in an enzyme solution containing 0.05% Pectolyase Y-23 and 1% Cellulase Onozuka RS for 1 hour without shaking. For the initial cell division and colony formation, the most suitable combination of growth regulators was 0.5 mg/l NAA and 1.0 mg/l zeatin. After 3 weeks in culture cell colonies developed to be 1 mm in diameter.

For plant regeneration, MS medium with 0.5 mg/l BA, 3% sucrose and 0.2% Gelrite was suitable. The regenerated shoots can be developed further and rooted on MS medium with 0.2 mg/l IAA and 0.05 mg/l GA₃.