

一般報文

メロン葉プロトプラストからの個体再生

豊田秀吉*・細井好之*・前田和彦**
 竹林晃男**・中東 豊**・大内成志*

*近畿大学農学部

(〒 631 奈良市中町 3327-204)

**近畿大学附属湯浅農場

(〒 643 和歌山県有田郡湯浅町)

(1990 年 10 月 25 日受付)

(1990 年 12 月 5 日受理)

細胞工学技術を植物の品種改良に応用し、病害抵抗性や薬剤耐性などの有用植物を育成することが可能となった¹⁾。メロンにおいても、筆者らの研究室をはじめ多くの研究室で細胞工学的研究が進められ、カルス組織の個体再生系が確立されるとともに^{2,3)}、最近では、アグロインフェクション法による形質転換体が作出された^{4,5)}。また、メロンのプロトプラストについても従来から培養系が検討され、子葉から得たプロトプラストでは根の分化⁶⁾や個体再生^{7,8)}が報告されるなど、細胞工学研究における基礎的諸条件が整いつつある。本研究では、育種的に意義があると考えられていたにもかかわらず、従来からその培養が困難であった本葉プロトプラストについて、効果的な個体再生系を確立することにした。

実験には、メロン (*Cucumis melo* L. 品種 Earl's Favourite) の夏系 1 号と夏系 4 号の F₁ 雑種個体を用いた。プロトプラストの調製には、使用する酵素類や浸透圧安定剤に加え、植物の成育状況が影響する場合が多い。筆者らの予備試験でも、幼苗育成期の日照量が不足すると葉肉が薄くなり、プロトプラストの調製が困難であった。そこで、本実験では、ガラス温室の自然日長下で育成したメロン苗を使用し、上位の若い展開葉を材料とした。すなわち、播種 10 日後のメロン幼苗を 3 週間 15~30°C のガラス温室で育成し、本葉が 6~7 枚展開した苗から、上位の若い葉を採取した。水洗したメロン葉は、70% のエタノールに 30 秒間、Tween-20 を数滴加えた 100 ml の 1% 次亜塩素酸ナトリウムに 3 分間浸漬し、滅菌水で洗浄した後、裏面表皮を剝離した。酵素としては、セルラーゼオノズカ R10 と RS (C-R10, C-RS) およびペクトリアーゼ Y-23 (P-Y23) を使用し、

0.1% の CaCl₂・2 H₂O と 0.5% のデキストラン硫酸カリウム (名糖産業) を含む溶液に溶解した。浸透圧安定剤にはマンニトールを使用し、酵素液の最終 pH を 5.7 とした。このようにして調製した酵素液を無菌濾過し、先の表皮剝離葉を浸漬して、26°C で 1~3 時間振とう (毎分 29 往復) した。得られたプロトプラストはステンレスメッシュ (孔径 53 μm) で濾過し、遠心洗浄で精製した。

以上の方法によって、まず、プロトプラストの安定化に及ぼすマンニトール濃度 (0.3~0.7 M) の影響を調べた。この実験には、C-RS および P-Y23 の濃度をそれぞれ 0.08 および 1.2% とし、2 時間振とうして得られたプロトプラストを用いた。その結果、マンニトールを 0.4 M とした区で最も高いプロトプラスト収量が得られ、濃度が増加するにつれてその収量も減少した。そこで、浸透圧安定剤には 0.4 M のマンニトールが最適であると考え、この濃度のマンニトールを酵素液に加えることにした。次に、ペクチン分解酵素ならびに細胞壁分解酵素の効果を検討するため、P-Y23 と C-R10 もしくは P-Y23 と C-RS を使用し、それぞれ 0.08, 0.1, 0.12% および 0.8, 1.0, 1.2% の濃度で組合わせた合計 18 とおりの酵素処理区を設け、プロトプラスト収量を比較した。その結果、P-Y23 と C-RS の組合わせで良好な結果が得られ、特に P-Y23 を 0.08%, C-RS を 1.2% とし、2 時間振とうしたときに、最も高いプロトプラスト収量 (生葉 1 g 当り 10⁷~10⁸ 個) が得られた (Fig. 1-A)。本実験で得られたプロトプラスト収量は、他の報告^{6~8)}と比較しても十分に高い値であり、以後の培養実験に使用することが可能であると考えた。

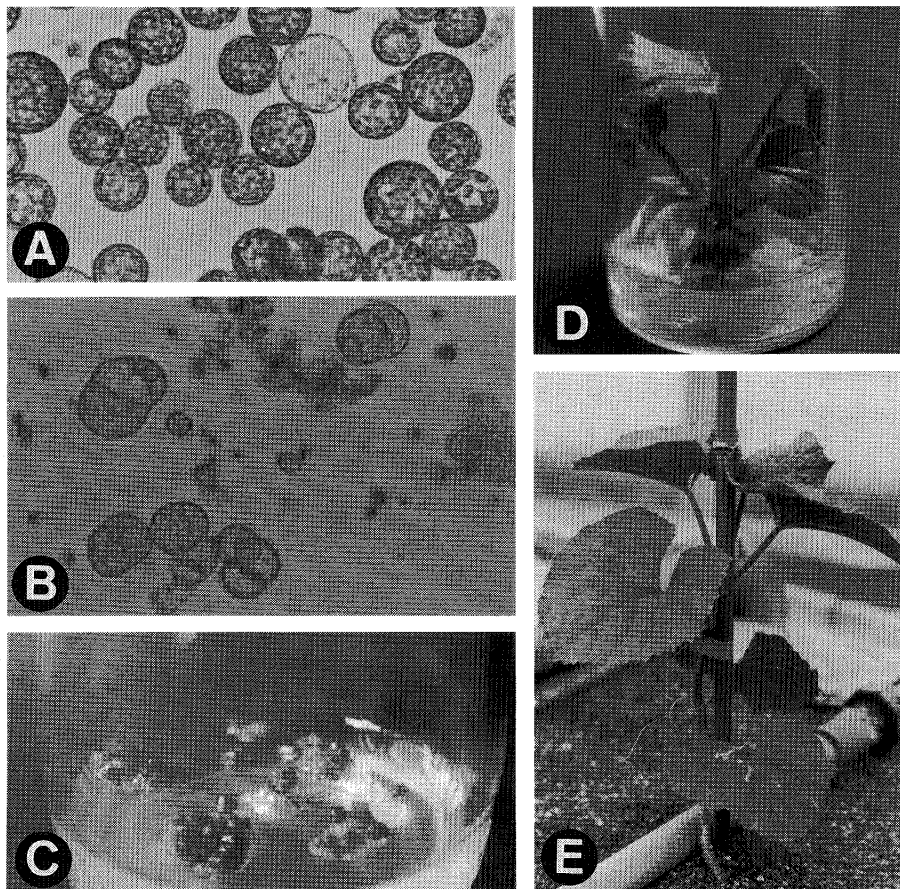


Fig. 1 Isolation and redifferentiation of protoplasts from melon leaves.

- A: Protoplasts from leaves treated with 0.08% Pectolyase Y-23 and 1.2% Cellulase Onozuka RS.
- B: Division of protoplasts in half strength of modified MS medium containing 0.1 mg/l 2, 4-D and 0.5 mg/l BA, and 0.4M mannitol (after 5 days incubation).
- C: Formation of green spots (arrow) in callus tissues transferred to normal strength of MS medium (without mannitol) containing 0.03 mg/l IAA and 1.0 mg/l BA (two weeks after transplantation from 2, 4-D and BA containing medium).
- D: Root formation of shoot in hormone-free MS medium (5-7 days after transfer).
- E: Regenerated melon plant growing normally in soil (one month after transplantation to soil).

プロトプラストの培養には、0.4 M のマンニトールを加え、培地強度を 1/2 に調整した Murashige - Skoog⁹⁾ (MS) 液体培地もしくは同培地の NH_4NO_3 を最終濃度で 500 mg/l となるように改変した 1/2 MS 液体培地を使用した。培地に添加するオーキシニンには、IAA, NAA および 2, 4-D, サイトカイニンには 6-benzylaminopurine (BA) とカイネチン (Ki) を用い、両者をそれぞれ組合わせた 合計 532 とおりの濃度区を設けた。また、培地のショ糖濃度は 1% とし、pH はすべて 5.7 とした。このようにして調製した培地を用い、 2×10^5 細胞/ml のプロトプラストを培養して、分裂・増殖に及ぼすホルモン効果を検討した。ホルモン効果の一

般的傾向としては、オーキシニン濃度を 0.05~0.1 mg/l, サイトカイニンを 0.5~1.0 mg/l の範囲で用いた場合に、プロトプラストの分裂が観察された。また、用いる培地の組成は 1/2 強度の MS 培地よりもその改変培地が適し、特に、2, 4-D を 0.1 mg/l, BA を 0.5 mg/l とした改変培地では、プロトプラストの分裂・増殖が最も良好で、最初の分裂が培養 5 日後に観察され (Fig. 1-B), さらに 12~15 日後にはカルス組織の形成が認められた。

以上の実験によって、プロトプラストの分裂やカルス誘導の条件を明らかにしたが、これらの条件下で培養を継続しても、カルスからの個体再生は観察されなかった。

そこで、プロトプラストから新たに誘導したカルス組織（培養15日後のカルス組織）をIAAとKiあるいはIAAとBAを添加した通常のMS固形培地（寒天濃度0.8%, ショ糖濃度3%, マンニトールを含まず）に移植し、26°C, 3,000~4,000 luxの全日長で培養して、個体再生に及ぼす影響を検討した。この実験では、IAAとKiもしくはIAAとBAの濃度をそれぞれ0~10 mg/lの11段階とした合計121とおりのホルモン濃度区を設け、2週間間隔で数回継代培養した。その結果、IAAを0.03 mg/l, Kiを1.0 mg/lとした区では、Fig. 1-Cに示すように、ほとんどすべてのカルスで緑色小斑が形成され、そのうち80%以上の小斑からはshootの分化が観察された。小葉を十分に展開したshootは、ホルモンフリー培地で発根した（Fig. 1-D）。また、温室で数日間馴化させた後、通常の土壌条件下で栽培したところ、順調に生育し（Fig. 1-E）、自殖種子の採取も可能であった。

以上のように、本研究では、メロン葉プロトプラストの再分化条件を検討したが、それぞれの過程に適したホルモンの種類や濃度は必ずしも同一ではなかった。なかでもプロトプラストのカルス化過程はとくに重要であり、プロトプラストの分裂・増殖を同調的に誘導できるホルモン条件を選択する必要があると考えた。このような条件下で誘導されたカルス組織は、細胞の形態も均質であり、また、添加したホルモンに対しても均一に反応する

ものと期待され、適当な再分化条件を検討すれば、容易に再生個体を得ることができると考えた。実際、本実験で誘導したカルス組織は、適当なホルモン条件に移し、3~4世代継代培養することによって、ほぼ同調的に緑色小斑を形成することが可能であった。このような結果は、本研究におけるホルモン条件の決定法が適切であったことを示唆する。今後は、これらの培養条件を基礎として、メロンの細胞工学的研究を進めることが可能であると考えた。

文 献

- 1) 豊田秀吉, 1990. 化学と生物, 28: 12-19.
- 2) 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, 1987. 植物組織培養 4: 8-12.
- 3) Moreno, V., M. Garcia-Sogo, I. Granell, B. Garcia-Sogo, L. A. Roig, 1985. Plant Cell Tissue Organ Culture, 5: 139-146.
- 4) Toyoda, H., Y. Hosoi, A. Yamamoto, T. Nishiguchi, K. Maeda, T. Takebayashi, S. Ouchi, 1990. Plant Tissue Culture Lett., (Submitted).
- 5) Fang, G., R. Grumet, 1990. Plant Cell Rept., 9: 160-164.
- 6) Matsumoto, S., I. Takebe, 1987. Plant Tissue Culture Lett., 4: 18-21.
- 7) 山中寿子, 天笠一美, 吉田 裕, 1990. Plant Tissue Culture Lett., 7: 103-107.
- 8) Li, P., Y. Sun, L. Zhang, X. Li, 1990. Plant Cell Rept., 9: 199-203.
- 9) Murashige, T., F. Skoog, 1962. Physiol. Plant., 5: 473-497.

Summary

Plant Regeneration from Leaf Protoplasts of Melon (*Cucumis melo* L.)

Hideyoshi TOYODA*, Yoshiyuki HOSOI, Kazuhiko MAEDA**,
Teruo TAKEBAYASHI**, Yutaka NAKAHIGASHI**
and Seiji OUCHI*

*Faculty of Agriculture, Kinki University, Nakamachi 3327-204, Nara 631, Japan

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

Melon leaf protoplasts were successfully regenerated into intact plants in this study. Protoplasts frequently divided and formed callus tissues when 0.1 mg/l 2, 4-D and 0.5 mg/l BA were added to half strength MS medium containing 0.4 M mannitol. Shoot formation was initiated when the callus tissues were transferred to solid MS medium containing 0.03 mg/l IAA and 1.0 mg/l BA. Shoots elongated roots in the absence of hormone and grew normally under in soil after acclimation. These regenerants produced viable seeds by self-pollination.