

メロン苗条原基・不定胚の生長抑制法による *in vitro* 保存法の開発

鈴木誠一*・下西 恵**・石川雅也・大澤勝次

農業生物資源研究所

(〒305 茨城県つくば市観音台 2-1-2)

*宮城県農業センター

(〒981-12 宮城県名取市高館川上字東金剛寺 1)

**鹿児島県バイオテクノロジー研究所

(〒893-16 鹿児島県肝属郡串良町細山田 4938)

(1991年4月22日受付)

(1991年6月28日受理)

植物体の再生が容易な苗条原基や不定胚を利用した形質転換実験が進められている¹⁾。しかし苗条原基は2~3週間間隔で継代培養することが必要であり²⁾、不定胚は同じステージのものを大量に得るのは容易ではない。このため苗条原基や不定胚の培養中の保存方法の開発が望まれている。

培養組織の保存方法には、大別して液体窒素を用いた半永久的な超低温保存法と、低温、生長抑制培地等を利用した *in vitro* での保存法である生長抑制法の2つがある。前者はハプロパップスの苗条原基³⁾、メロン⁴⁾、ニンジン⁵⁾、スイートオレンジ⁶⁾の不定胚で報告されており、後者はニンジンの不定胚^{7,8)}で報告されている。また超低温保存に際して細胞の耐凍性を向上させるには、

低温処理や、ショ糖濃度の高い培地、または ABA (アブシジン酸) を含む培地で前培養する方法等が知られている⁹⁾。

本報では培養温度、培地中のショ糖濃度及び ABA 濃度・処理期間について検討することにより、メロンの苗条原基については継代間隔の延長を可能にし、不定胚については同一ステージの胚を大量に揃えることを可能にしたので報告する。

苗条原基は 'プリンス' を使い、基本培地として MS (pH 5.8, 以下同じ) + BA 1 mg/l + ショ糖 3% の液体培地に置床し、25°C、蛍光灯の連続照明下 (3,000 Lux) で継代¹⁰⁾しているものを供試した。

まず、培養温度及び培地中のショ糖濃度について検討

Table 1. Effect of temperature and sucrose concentration on preservation of melon cultured shoot primordia (cv. Prince).

Temp. (°C)	Sucrose (%)	Growth reduction rate (%)	Survival rate (%)	Shoot regeneration rate (%)
25	3	0	100	60
25	10	68.4	30	30
15	3	76.3	20	10
15	10	94.7	20	0
5	3	96.8	0	0

Growth reduction rate was obtained after 20 days of preservation. Survival rate and shoot regeneration rate were obtained after 30 days of reculture and after 40 days of preservation, respectively.

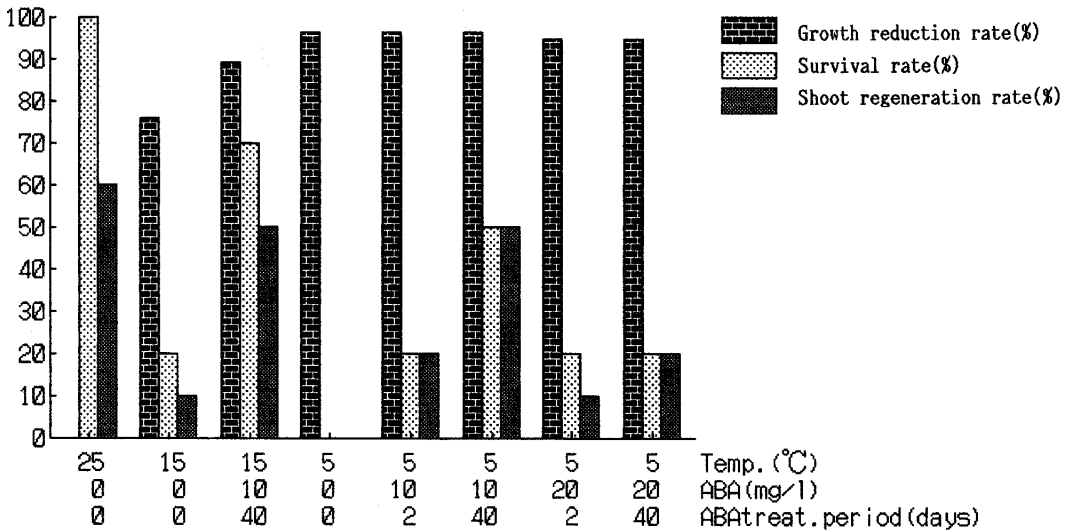


Fig. 1 Effect of temperature, ABA concentration and treatment period on preservation of cultured melon shoot primordia (cv. Prince).

Growth reduction rate was obtained after 20 days of preservation. Survival rate and shoot regeneration rate were obtained after 30 days of reculture and after 40 days of preservation, respectively.

した。苗条原基を継代時に直径約1 cmに分割し、基本培地のショ糖を3, 10%にした培地に置床し、25, 15, 5°Cの照明下、2 rpmで回転培養した。対照区は基本培地に置床し、25°Cで培養した。各区10個体を供試した。20日間培養後の生長抑制率、及び40日間培養後、MS+BA 0.2 mg/l+ショ糖3%+ゲルライト0.2%に移植し、30日間再培養しての生存率、莖葉再分化率を調査した。生長抑制率は、対照区の生重の増加を100とした場合の各区の割合を100から減じたもので示した。

その結果、苗条原基では培養温度が低下、並びにショ糖高濃度区で培養中の生長抑制率が上昇したが、再培養後の生存率及び莖葉再分化率は低下した (Table 1)。苗条原基は低温 (5°C) に対する耐性が低く、またショ糖高濃度区 (10%) でも低温耐性は向上しなかった。

次に、培養温度及び培地中の ABA 濃度・処理期間について検討した。苗条原基を ABA 0, 10, 20 mg/l を含む基本培地に置床し、25, 15, 5°C で 20 日間培養後の生長抑制率、及び 40 日間培養後 30 日間再培養しての生存率、莖葉再分化率を調査した。ABA を含む培地で 2 日間培養後、基本培地に移植して培養する区及び ABA を含む培地中で 40 日間培養する区を併せて設けた。

その結果、苗条原基では ABA 処理により生長抑制率、並びに再培養後の生存率、莖葉再分化率が上昇し、ABA 処理濃度は 10 mg/l で、処理期間は 40 日間でよ

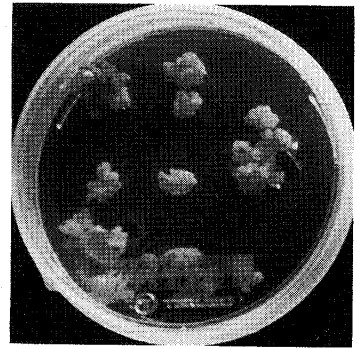


Fig. 2 Shoot regeneration of melon cultured shoot primordia after 40 days preservation on a medium containing 10 mg/l of ABA at 15°C.

い結果になった (Fig. 1, 2, 3)。メロンの苗条原基では ABA 処理により低温に対する耐性が向上したものと考えられるが、このことはブロムグラスの懸濁培養細胞での ABA 処理による耐凍性の誘導の報告¹¹⁾と一致するものである。

不定胚は「サンデー秋型」を用い、種子の胚軸部分を MS+NAA 4 mg/l+2, 4-D 1 mg/l+BA 0.1 mg/l+ショ糖 3%+ゲルライト 0.2% の固形培地に置床して、誘導した。

まず、培養温度及び培地中のショ糖濃度について検討した。不定胚は長さ約 1 mm のものを基本培地 1/2MS+ゲルライト 0.2% のショ糖を 3, 10% にした培

Table 2. Effect of temperature and sucrose concentration on preservation of melon somatic embryos(cv. Sunday Akigata).

Temp. (°C)	Sucrose (%)	Growth reduction rate(%)	Regrowth rate (%)	Plantlet formation rate(%)
25	3	0	100	50
25	10	58.3	83.3	10
15	3	75.0	81.0	10
15	10	83.3	46.4	0
5	3	88.8	78.1	30

Growth reduction rate was obtained after 10 days of preservation. Regrowth rate and plantlet formation rate were obtained after 10 days of reculture and after 30 days of preservation, respectively.

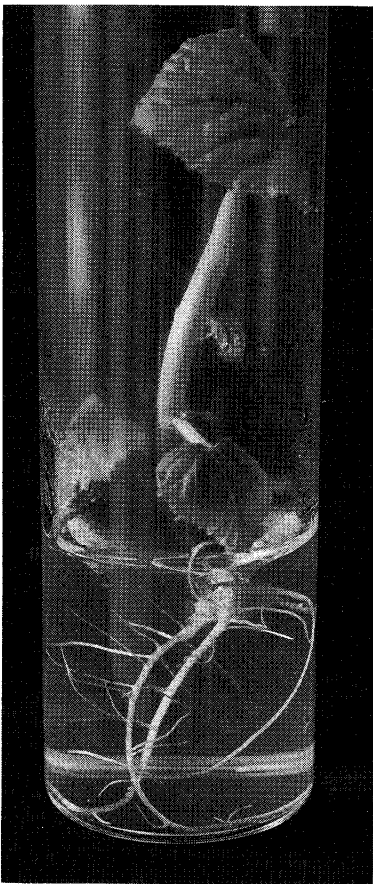


Fig. 3 Regenerated plantlet of a melon cultured shoot primordium after 40 days preservation on a medium containing 10 mg/l of ABA at 15°C.

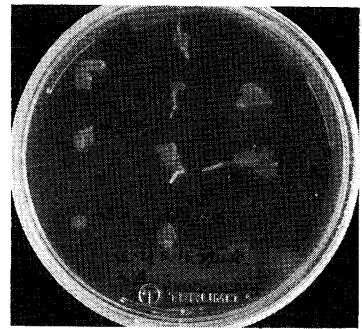


Fig. 4 Regrowth of melon somatic embryos after 30 days preservation at 5°C.

10日間再培養しての生長率、本葉展開率を調査した。生長抑制率は、対照区の(縦長+横長)/2の増加を100とした場合の各区の割合を100から減じたもので示した。生長率は、10日間再培養後の対照区の(縦長+横長)/2の増加を100とした場合の各区の割合で示した。

その結果、不定胚は培養温度が低下、並びにショ糖高濃度区で、培養中の生長抑制率が上昇した。また再培養後の生長率はショ糖高濃度区で低下したが、培養温度には影響を受けなかった。さらに再培養後の本葉展開率は対照区を除けば5°Cで最も高くなった(**Table 2, Fig. 4, 5**)。このことは、メロンの不定胚が低温(5°C)に耐性はあるが、ショ糖高濃度(10%)では悪影響を受けることを示すものと考えられた。ニンジンの不定胚ではショ糖を含まない培地で25°Cで2年間生存したとの報告⁷⁾もあり、メロンについてもショ糖無添加培地における保存実験が今後の課題となろう。

地に置床し、25、15、5°Cの照明下で培養した。対照区は基本培地+ショ糖3%に置床し、25°Cで培養した。各区10個体を供試した。10日間培養後の生長抑制率、及び30日間培養後、基本培地+ショ糖3%に移植し、

次に、培養温度及び培地中のABA濃度・処理期間について検討した。不定胚をABA 0, 10, 20 mg/lを含む基本培地+ショ糖3%に置床し、25, 15, 5°Cで10日間培養後の生長抑制率、及び30日間培養後10日間再培

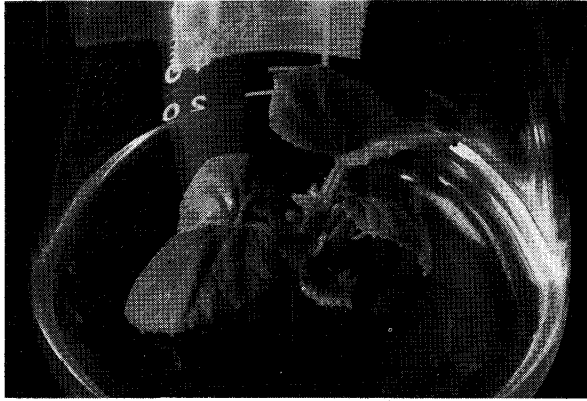


Fig. 5 Regenerated plantlet of a melon somatic embryo after 30 days preservation at 5°C.

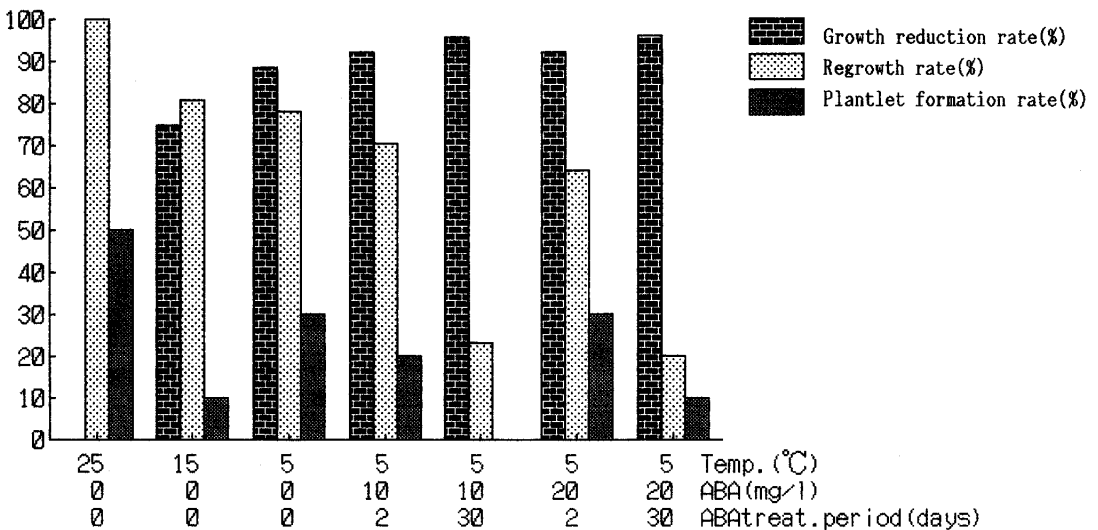


Fig. 6 Effect of temperature, ABA concentration and treatment period on preservation of melon somatic embryos (cv. Sunday Akigata).

Growth reduction rate was obtained after 10 days of preservation. Regrowth rate and plantlet formation rate were obtained after 10 days of reculture and after 30 days of preservation, respectively.

養しての生長率、本葉展開率を調査した。ABA 処理は苗条原基と同様に行った。

その結果、不定胚では ABA 処理は生長抑制率に影響しなかったが、30 日間処理は再培養後の生長率、及び本葉展開率を低下させた (Fig. 6)。このことは、メロンの不定胚に対する長期間の ABA 処理は生育に悪影響を及ぼすものと考えられる。これはニンジンの不定胚の実験で Kitto ら¹²⁾が示した低温による ABA レベルの上昇と関係があるかもしれない。

以上の結果、メロンの苗条原基は ABA 10 mg/l を含む MS 培地で 15°C の培養条件下で 40 日間の保存が可能となり、不定胚は 5°C の培養条件下で 30 日間の保存が可能となった。この生長抑制法による保存法を活用す

ればメロンの苗条原基の継代間隔を現在の 2~3 週間から 5~6 週間に延長することが可能となり、不定胚では 20~30 日間に誘導される不定胚を特定のステージで生長を抑制することにより、ステージを揃えて実験に供することが可能となる。またメロンの苗条原基は ABA 処理により低温に対する耐性を向上させ得ること、及びメロンの不定胚は苗条原基に比べ低温耐性があることも明らかになった。

文 献

- 1) 吉岡啓子, 花田薫, 野村幸雄, 井上真奈美, 美濃部侑三, 大澤勝次, 1989. 育種, 39 (別 2): 6-7.
- 2) 永井輝行, 野村幸雄, 大澤勝次, 1989. 園学雑, 58 (別 1): 208-209.

- 3) Taniguchi, K., R. Tanaka, N. Ashitani, H. Miyagata, 1988. *Jpn. J. Genet.*, **63**: 267-272.
- 4) Shimonishi, K., M. Ishikawa, S. Suzuki, K. Oosawa, 1991. *Japan. J. Breed.*, **41**: 347-351.
- 5) Withers, L. A., 1979. *Plant Physiol.*, **63**: 460-467.
- 6) Marin, M. L., N. Duran-Vila, 1988. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, **14**: 51-57.
- 7) Jones, L. H., 1974. *Plant Sci. Lett.*, **2**: 221-224.
- 8) 貝守昇, 1988. *東北大農研報*, **39**: 21-27.
- 9) 菅原康剛, 1987. *凍結保存 (酒井昭編)*, p. 170, 朝倉書店, 東京.
- 10) 下西恵, 野村幸雄, 永井輝行, 吉岡啓子, 大澤勝次, 1989. *育種*, **39** (別2) : 110-111.
- 11) Ishikawa, M., A. J. Robertson, L. V. Gusta, 1990. *Plant Cell Physiol.*, **31** (1): 51-59.
- 12) Kitto, S. L., J. Janick, 1985. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **110** (2): 283-286.

Summary

In Vitro Preservation of Cultured Shoot Primordia and Somatic Embryos in Melon by Growth Retarding Method

Seiichi SUZUKI*, Kei SHIMONISHI**, Masaya ISHIKAWA and Katsuji OOSAWA

*National Institute of Agrobiological Resources, 2-1-2 Kannondai,
Tsukuba, Ibaraki 305, Japan*

**Miyagi Prefecture Agricultural Reserch Center, 1 Higashikongouji,
Kawakami, Takadate, Natori, Miyagi 981-12, Japan*

***Kagoshima Biotechnology Institute, 4938 Hosoyamada, Kushira, Kimotsuki,
Kagoshima 893-16, Japan*

We attempted *in vitro* preservation of cultured shoot primordia and somatic embryos of melon by examining incubation temperature, sucrose concentration in the medium, and the inclusion of abscisic acid and its treatment period. Cultured shoot primordia of melon (cv. Prince) were successfully preserved for 40 days at 15°C in a liquid MS medium containing 3% sucrose and 10 mg/l ABA rotated at 2 rpm. Inclusion of a higher concentration of sucrose (10%) or incubation at 5°C reduced viability and shoot regeneration after storage. Somatic embryos of melon (cv. Sunday Akigata) were best preserved for 30 days on a half strength MS medium with 3% sucrose and 0.2% gelrite and in the absence of ABA at 5°C. Inclusion of 10% sucrose or ABA resulted in a decreased rate of regrowth. By these growth retarding methods, subculture intervals of cultured shoot primordia could be extended and somatic embryos could be arrested at a particular growth stage. Somatic embryos seemed more tolerant to low temperature than cultured shoot primordia.