

メロンの苗条原基誘導と植物再生能の維持

下西 恵*・永井輝行**・野村幸雄***・吉岡啓子†・大澤勝次††

農業生物資源研究所

(〒305 つくば市観音台 2-1-2)

*鹿児島県バイオテクノロジー研究所

(〒891-36 鹿児島県肝属郡串良町細山田 4938)

**福井県農業試験場

(〒910 福井市寮町辺操 52-21)

***福井県園芸試験場

(〒919-11 福井県三方郡美浜町久々子 35 号 32-1)

†北海道大学農学部

(〒060 札幌市北区北 9 条西 9 丁目)

††現 茨城県生物工学研究所

(〒319-02 茨城県西茨城郡岩間町安居)

(1992 年 6 月 18 日受付)

(1992 年 9 月 12 日受理)

メロンの苗条原基の誘導と植物体再生のための培地条件の検討を行い、長期の継代に伴う苗条原基の植物再生能の変化や形態的な変化について検討した。苗条原基の誘導にはグリーンパール及びプリンスの 2 品種を用い、葉原基 2~3 枚をつけた茎頂を外植体とした。誘導条件は温度 25°C、照度 3,000 lx の連続照明下での回転培養(2 rpm)とし、ベンジルアデニン(BA)とナフタレン酢酸(NAA)を組み合わせた MS 液体培地を用いた。その結果、BA 0.5~4.0 mg/l と NAA 0.01 mg/l の組み合わせで効率よく苗条原基が誘導され、これらの苗条原基は BA 0.1~0.4 mg/l の MS 固形培地に移植することにより容易に植物体を再生した。苗条原基の長期の継代には BA 1 mg/l の培地が適当で、2~3 週間間隔で継代し 4 年近く維持している。長期にわたる苗条原基の維持には継代時に典型的な集塊を移植することが適当であり、その植物再生能は長期間の継代を経ても高率に維持された。従って、この培養系は形質転換を含む組織培養の種々の実験系や新しい遺伝資源の保存形態として多くの場面で利用可能であると考えられた。

1. 緒言

組織培養による植物のクローン増殖の系には、ウィルスフリー化を主たる目的とした茎頂培養のほか、不定芽や不定胚の系など種々の系があるが、それぞれ再生効率やクローン性に違いがあるため、利用する植物種及び種苗生産あるいは育種利用といった目的の違いにより使い分けられている。メロン(*Cucumis melo*, L)の培養系については、Oridate and Oosawa(1986)が完熟種子の子葉部を外植体とし 2,4 ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-

D)及び BA を用いて液体振とう培養することにより不定胚を誘導し植物体を再生させた報告がある¹⁾。その後さらに Homma *et al.* (1991)が完熟種子を細分して培養部位について詳細に検討することにより体細胞胚形成の効率を高め²⁾、Kageyma *et al.* (1990)が外植体として種子以外の茎頂、茎及び本葉を用いた体細胞胚形成について報告するなど³⁾、不定胚形成による再分化系がいくつか報告されている。また、Dirks and Van Buggenum (1989)により完熟種子の子葉部分を細断したものを外植

体として BA のみを用い多数の不定芽を誘導する系も報告されている⁴⁾。これらの系はかなり効率の高いものとなっているが、遺伝的なクローン性についての保証はなく、不定胚培養系については江面ら(1992)が高頻度で4倍体が出現することを報告している⁵⁾。

これに対し、最初に Tanaka and Ikeda(1983)により *Hoplopappus gracillis* を用いて茎頂を回転培養することにより誘導された苗条原基は⁶⁾、染色体レベルでは遺伝的に非常に安定な培養形態であることが明らかにされるとともに、キク科植物を中心として多くの植物種でその誘導が試みられ、52種の植物種で誘導されたとの報告(谷口・田中, 1988)がある⁷⁾。しかしながら、長期継代の可能性や継代に伴う植物再生能の変化の有無に着目した報告はほとんどない。

本報では、メロンの苗条原基の誘導と植物再生の条件について明らかにするとともに、誘導した苗条原基の長期継代とその植物再生能の維持について検討を行った。

2. 材料および方法

(1) 苗条原基の誘導・植物再生・継代条件

品種はグリーンパール(GP)及びプリンス(P)を用い、無菌播種後21~25日目の植物体の茎頂部位を約0.5 mmの大きさに切り出したものを外植体とした。これを種々の濃度のNAA及びBAを組み合わせた計20種類のMS液体培地(ショ糖3%, pH5.8, Table 1)に置床し、径45 cmの小型の傾斜回転培養器(径25 mmの平底試験管100本架、1本の試験管に20 mlの培地を使用)を用いて毎分2回転で回転培養した。培養温度は25°C、照明は上部約3,000 lxの蛍光灯による連続照明とした。なお、マイクロスライサー(DSK社)を用いて回

転培養中の茎頂の変化について組織学的観察を行った。

誘導された苗条原基を分割し、サイトカイニン(BA及び4-PU; 4-ピリジルフェニルウレア)とオーキシシン(2,4-D及びNAA)を組み合わせた15種類のMS寒天培地(ショ糖3%, pH5.8, 寒天0.8%)に移植して植物体再生条件を検討した。

また、苗条原基の継代条件については、誘導効率の最も高かった培地及びそれからNAAを除去した培地とを用い、2週間及び4週間の継代間隔の差が苗条原基の維持・増殖に及ぼす影響を調査することにより行った。

(2) 継代に伴う苗条原基の形態と植物再生能の変化

プリンスで誘導された苗条原基を用い、MS+BA 1 mg/l(ショ糖3%, pH5.8, これを培地Iとする)及びMS+BA 0.5 mg/l+KIN(カイネチン)0.5 mg/l(これを培地IIとする)の液体培地を用い、当初は継代間隔2週間で、後には3週間で継代した。回転培養の条件は誘導時と同様とした。

継代時に10~15 mm程度となった苗条原基を3~5 mmの大きさにピンセットを用いて分割し、再び継代培養するものと植物体再生を図るものとに区分して培養した。この場合、苗条原基の形態としてコンパクトで緑色の濃い典型的なタイプのもの、茎葉が伸長し始めたものの、カルス化した部分を含むものなど差異が見られたので、継代に伴うこれらの出現割合を調査し、継代にはなるべく典型的なタイプのものを選んで行った。

苗条原基からの植物再生は、MS+BA 0.1, 0.2 及び0.4 mg/l(ゲルライト0.2%)の培地を用いた。植物再生能の判定は、再生培地に置床した苗条原基の茎葉の伸長を観察して行った。

Table 1. Effect of NAA and BA on shoot primordia induction.

Cultivar	NAA Conc. (mg/l)	BA Conc. (mg/l)			
		0.5	1.0	2.0	4.0
Green Pearl	0.0	PB2	PB1 PB+SP1	PB2 D1	PB3
	0.01	PB+SP2 D1	PB+SP3	PB1 PB+SP2	PB+SP2 C1
	0.02	PB+SP1 D2	PB+SP2 C1	PB+SP1 C2	G1 C2
	0.05	PB1 C2	C1 D2	C+SP1 C1 D1	C3
	0.1	C2 D1	C2	C2 D1	C2 D1
Prince	0.0	PB1 G1 C1	PB2	PB+SP2 D1	PB2 G+SP1
	0.01	PB+SP3	PB+SP1 C+SP2	C+SP2 C1	G+SP2 D1
	0.02	PB1 C+SP1 D1	C+SP2 C1	C+SP1 C2	C2 D1
	0.05	C+SP1 C1 D1	C2 D1	G1 D2	C2 D1
	0.1	C1 D2	D3	C1 D2	C3

1) PB: Precocious branch, SP: Shoot Primordia, G: Green body, C: Callus, D: Death. (Figures show the number of explants.)

2) 'Green Pearl' was cultured for 53 days and 'Prince' was 41 days.

なお、初期の誘導時点でその由来が3通りに区分されたので、継代や植物再生についてもその区分をした上で調査した (Table 4, Table 5).

3. 結果および考察

(1) 苗条原基の誘導

BA と NAA を組み合わせた 20 種類の誘導培地のうち、グリーンパールでは 8 種類の培地で、プリンスでは 10 種類の培地で培養開始後 6~8 週間後に苗条原基が誘導された。これらは組織切片の観察及び後述する植物体の再生を確認した上で苗条原基といえるものであると判断された。苗条原基の誘導効率はいずれの品種でも BA よりも NAA の濃度に影響され、NAA 0.01 mg/l の濃度において最も効率よく形成された (Table 1)。苗条原基が形成された培地では早生分枝状となるものも同時にみられ、また NAA 0.05 mg/l 及び 0.1 mg/l の培地ではほとんどがカルス化するか枯死した。

回転培養中の茎頂の経時的変化について組織学的観察を行ったところ、置床直後は葉原基が急速に伸長したが、培養後 4 日目になると早くも新しい生長点が観察され始め、その後日数の経過とともに生長点の数は増加していった (Fig. 1)。したがって、メロンの苗条原基は多数の腋芽の原基の集塊であると判断された。

苗条原基誘導の過程における外植体(茎頂)の形態的变化をさらに詳細に検討したところ、次のような 5 つのタイプに分類できた。すなわち①茎頂がそのまま生育し

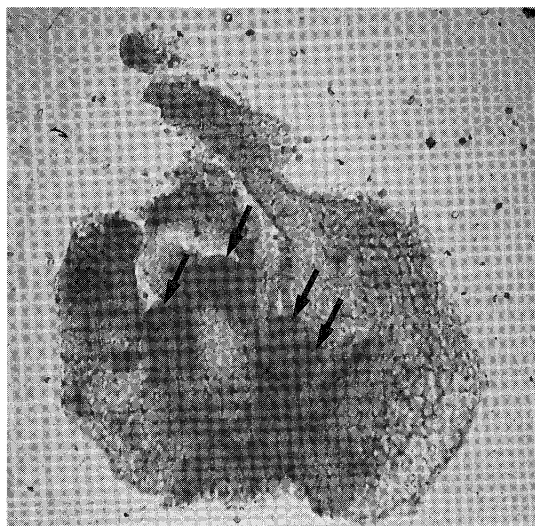


Fig. 1 Longitudinal section of shoot apex cultured for 6 days.

Arrows indicate the increased meristems.

た早生分枝状のもの (PB), ②葉原基が異常に肥大したもの (GB), ③生育した葉の表面にこぶ状の組織をもつもの, ④茎頂の切断部にこぶ状の組織をもつもの, ⑤茎頂の切断部にカルスとこぶ状の組織をもつもの, である。これらのうち③, ④, ⑤についてそのこぶ状の部分分離してさらに培養を続けたところ、すべてが苗条原基となった。これらは濃緑色を呈し、表面に多くの突起を有

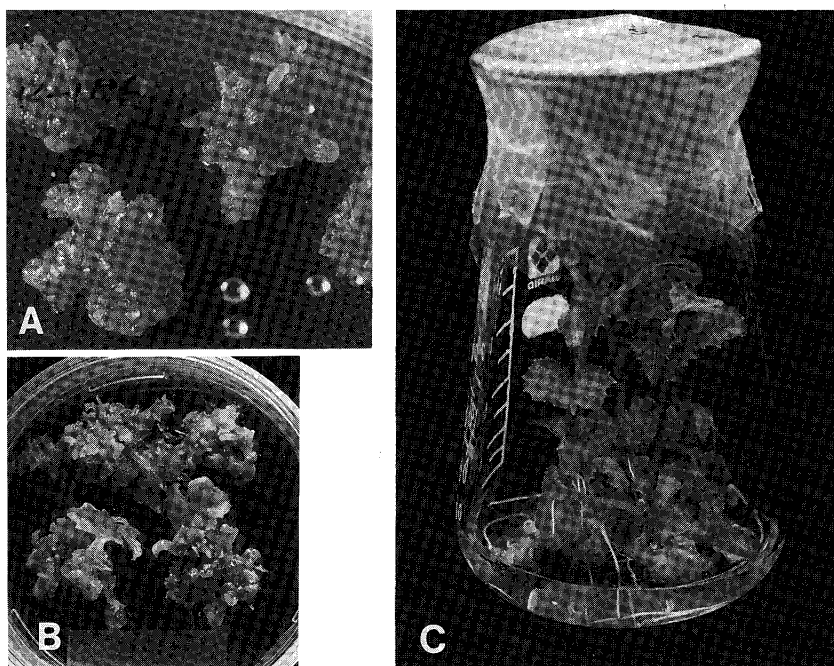


Fig. 2 Regenerated shoots (A; just differentiated, B; much developed) and a plantlet (C).

Table 2. Effect of auxins and cytokinins on shoot formation from shoot primordia.

Auxin Conc. (mg/l)	Cytokinin. (mg/l)		
	0	BA 0.2	4PU 0.2
0	SP3 SP+C2	SP1 SP+S4	—
NAA 0.2	SP+C5	SP+C5	SP+C5
NAA 2.0	SP+C4	SP+C4	SP+C4
2,4-D 0.2	SP+C5	SP1 SP+C4	SP+C5
2,4-D 2.0	SP+C5	—	SP+C5

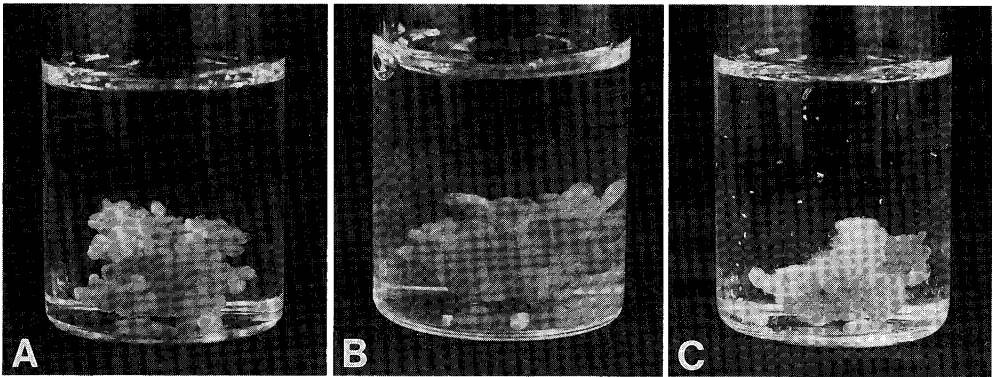
- 1) S: Shoot, SP: Shoot Primordia, C: Callus, —: Contamination. (Figures show the number of explants.)
 2) The cultivar was 'Prince' and they were cultured for 20 days.

Table 3. Effect of media and intervals on shoot primordia subcultured for 8 weeks (cv. Prince).

Media*2	Intervals of subculture	No. of SP cultured	Morphology of SP*1			
			D	C	SP+	SP++
+NAA	2 weeks	6	2	3	0	1
	4 weeks	8	5	0	3	0
-NAA	2 weeks	6	0	1	0	5
	4 weeks	8	3	1	2	2

*1 C: Callus, D: Death, SP+: Maintained as SP, SP++: Maintained as typical SP.

*2 Basal medium was MS+BA 1 mg/l, and concentration of additional NAA was 0.01 mg/l.

**Fig. 3** Three types of subcultured shoot primordia ; T-SP(A), L-SP(B) and C-SP(C).

しており、後に典型的な苗条原基となった(**Fig. 3**)。なお、誘導後の継代は上述の③、④、⑤の由来を区分して行い、以下それぞれ‘葉由来’‘茎由来’及び‘カルス由来’と略して表した(**Table 4, 5**)。

(2) 苗条原基からの植物再生

苗条原基からの植物再生(シュートの伸長)は、供試し

た15種類の培地のうちBA 0.2 mg/lの単独添加培地で認められ(**Fig. 2-A**)、その他の培地ではすべて苗条原基のままか、一部カルス化した(**Table 2**)。伸長したシュートをMSホルモンフリー培地に移植すると発根して茎葉が生長し、速やかに幼植物体へと生育した(**Fig. 2-B, C**)。

Table 4. Morphological changing of subcultured shoot primordia.

Origin*1	Subculture Media*2	Types of SP (%)*3				T-SP*4 from T-SP	T-SP*5 to T-SP	
		T-SP	L-SP	C-SP				Callus
				+	++			
Callus	I	58	10	10	20	2	72	47
	II	63	20	7	10	0	68	53
Stem	I	71	21	1	7	0	77	73
	II	73	16	5	6	0	89	66
Leaf	I	76	7	9	8	0	80	64
	II	81	6	6	7	0	87	69

*1 Shoot primordia were distinguished by their original site of induction.

*2 Subculture media; MS+BA 1 mg/l(I) and MS+BA 0.5 mg/l +Kin 0.5 mg/l(II).

*3 Shoot primordia were classified as: typical (T), leaflet (L) or with callus (C).

*4 The percentage of T-SP derived from T-SP at the former subculture.

*5 The percentage of T-SP maintained as T-SP also at the next subculture.

(3) 苗条原基の継代

継代培地については、誘導培地と同じ NAA を含む培地では苗条原基はカルス化したり枯死する割合が高くなり、BA 1 mg/l の培地が苗条原基としてよく保たれ、継代に適していた。継代間隔についてみると、2 週間間隔のものがよりコンパクトな状態で保たれ、4 週間間隔になると苗条原基のコンパクトさがやや失われ、カルス化もしくは枯死するものが多くなった (Table 3)。

しかし、継代が進み典型的なコンパクトな苗条原基を選択的に維持することが可能になると 3 週間の継代間隔でも十分であることが観察されたので、誘導 6 カ月からは継代間隔を 3 週間とした。誘導直後は苗条原基としてまだ不安定な状態にあるため、2 週間という比較的短い間隔の継代が必要であると考えられた。

ハプロパップス(田中, 1983)の場合は一次苗条原基の外側に二次苗条原基が形成され、その部分が増殖してもとの苗条原基から自然に分離していくという形態をとっていた⁹⁾。これに対し、メロンの苗条原基の増殖の形態はそれとは異なり自らは分離しないため、継代時にピンセットを用いて人為的に分割する必要があった。このように苗条原基の増殖形態については植物種により多様であることが示唆された。

(4) 継代に伴う形態の変化

苗条原基を継代時に観察すると、コンパクトで典型的な苗条原基の状態を保ったもの(以下 Typical Shoot Primordia=T-SP という)、苗条原基の茎葉が伸長し始めて突起した状態となったもの(Leaflet SP=L-SP)、苗条原基とカルスが混在したもの(Callus SP=C-SP)の 3 タイプに大別することができた (Fig. 3-A~C)。そこ

で苗条原基の由来及び継代培地(培地 I 及び培地 II)の違いにより継代中に形態の差が生ずるかどうか、また苗条原基のタイプが継代により別のタイプに変化するかどうかについて調査した。その結果カルス由来のものはカルス化しやすい傾向にあり、茎由来のものはやや茎葉が分化しやすく、葉由来のものは典型的な苗条原基の状態維持されやすかった。継代培地による差はほとんどなかった (Table 4)。

また、典型的な苗条原基と判断されたものが最も多かった葉由来についてみると、前回の継代時に T-SP であった割合は 80~87% の高率であったが、今回の継代時にも T-SP となった割合は 64~69% と低くなった (Table 4)。このことから、T-SP を継代すれば高率に T-SP として維持されるわけではないが、T-SP を維持するためには T-SP を丹念に継代する事が必要であるといえる。

(5) 継代に伴う植物再生能の維持

苗条原基誘導後、経時的に植物再生能の変化を調べた。由来や継代培地の種類によっても差はみられるが、植物再生能は全体として高率に維持されていることがわかった。継代時により若干の差はみられたが、経時的に低下する傾向はなく、30 週~53 週まで継代を重ねた時点での植物再生能は由来や培地等を全て込みにした平均で 70~98% と高率に維持された (Table 5)。長期間継代した苗条原基についての植物再生能の調査は BA 濃度を 0.1, 0.2, 0.4 mg/l とした培地も検討したが、これらの濃度間で特に顕著な差は認められなかった。植物再生能はその後さらに約 3 年の継代を経た時点でもおおむね 8 割程度に維持されており、メロンの苗条原基におけるこ

Table 5. Regeneration potential of subcultured shoot primordia (%) *¹.

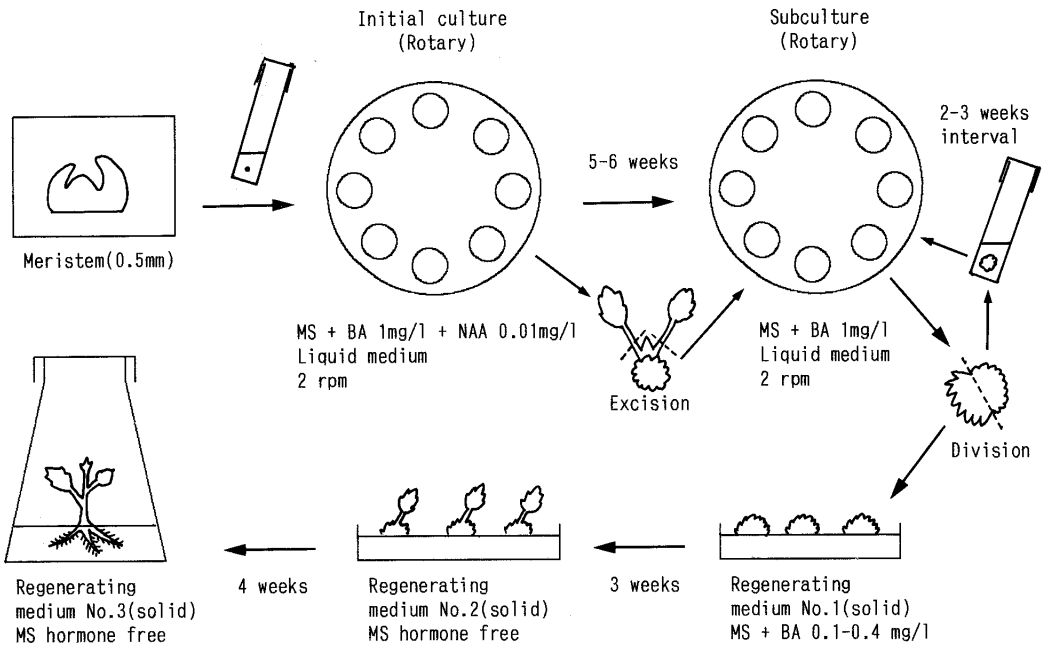
Origin* ²	Subculture media* ²	Duration of subculture (weeks)* ³							
		30	32	35	38	41	44	47	53
Callus	I	83	75	—	75	71	78	74	91
	II	94	67	57	88	97	100	92	75
Stem	I	79	92	—	80	97	100	70	92
	II	90	90	77	100	94	100	86	77
Leaf	I	88	100	—	86	97	100	82	79
	II	80	100	82	92	100	100	82	70
BA conc. of regeneration media (mg/l)	0.1	88	92	57	79	97	—	—	—
	0.2	83	92	83	88	94	98	91	80
	0.4	86	82	70	100	94	—	—	—
Mean of all* ⁴		84	86	70	87	96	98	91	80

*¹ Data were expressed by the frequency of differentiated shoot primordia of all those cultured on each regeneration media.

*² Origin and subculture media are the same to **table 4**.

*³ Period from the initial induction.

*⁴ Average of all origins, subculture media and regeneration media.

**Fig. 4** A protocol for induction and subculture of melon shoot primordia and plant regeneration.

の継代方法が実用に耐えるレベルに達していると考えられた。

(6) メロン苗条原基の誘導・植物再生・継代のプロトコール

以上の結果を総合してメロン苗条原基の誘導から植物再生・継代にいたるプロトコールを図示した (**Fig. 4**)。メロンの場合、初代の回転培養中に葉原基が伸び、その

ままでは苗条原基化しなかったが、1カ月程度たった時点で基部のこぶ状の部分を残し伸長した部分を切除して培養を続けたことが苗条原基誘導のポイントになった。

また、これまでいくつか報告のある苗条原基は、10,000 lx 程度の強光下で、しかも直径 1 m 程度の大型の回転培養器を用いたものが多かった。培養に用いる試験管についても基本的には多くの場合 30 mm×200 mm

の丸底のものが使われているが⁹⁾、これらは植物種によっ
ては必ずしも必須の条件ではなく、誘導条件について
も多様であることが示唆された。

苗条原基は多くの植物種で誘導されているが、増殖率、
苗条原基としての維持や再分化などの点で問題のあるも
のも多いとされている¹⁰⁾。メロンの場合は長期の継代後
も植物再生能を失うことなしに苗条原基の維持が可能で
あることから、形質転換系を含む組織培養の実験系とし
て利用できるだけでなく、実際にクローン増殖の系とし
て使える可能性も持っている。苗条原基は染色体レベル
での安定性の高いことがハプロパップスで示されている
が、本培養法によるメロンの遺伝的な安定性や長期の継
代による遺伝的変異の有無については今後の重要な課題
として残されている。

文 献

- 1) Oridate, H., K. Oosawa, 1986. *Japan. J. Breed.*, **36** : 424-428.
- 2) Homma, Y., K. Sugiyama, K. Oosawa, 1991. *Japan. J. Breed.*, **41** : 543-551.
- 3) Kageyama, K., K. Yabe, S. Miyajima, 1990. *Plant Tissue Culture Letters*, **7**(3) : 193-198.
- 4) Dirks, R., M. van Buggenum, 1989. *Plant Cell Rep.*, **7** : 626-627.
- 5) Ezura, H., H. Amagai, K. Yoshioka, K. Oosawa, 1992. *Japan. J. Breed.*, **42** : 137-144.
- 6) Tanaka, R., H. Ikeda, 1983. *Jpn. J. Genet.*, **58** : 65-70.
- 7) 谷口研至, 田中隆荘, 1988. 育種学最近の進歩第29集, 105-114.
- 8) 田中隆荘, 1983. 種苗産業と育種新技術, p.171-197, シーエムシー, 東京.
- 9) 大澤勝次, 西村繁夫, 木村康夫, 矢部和則, 春木和久, 桑原宏司, 1989. 農業技術, **44** : 273-278, 319-324, 368-373.
- 10) 谷口研至, 1990. 植物細胞工学, **2** : 249-255.

Summary

Induction of Melon Shoot Primordia and Maintenance of Their High Regeneration Potential

Kei SHIMONISHI*, Teruyuki NAGAI**, Yukio NOMURA***,
Keiko YOSHIOKA[†] and Katsuji OOSAWA^{††}

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

**Kagoshima Biotechnology Institute, 4938, Hosoyamada,
Kushira, Kagoshima, 896-16 Japan*

***Fukui Prefecture Agricultural Experiment Station,
Ryomachi, Fukui, 910 Japan*

****Fukui Prefecture Horticultural Experiment Station,
Mihama, Fukui, 919-11 Japan*

[†]*Faculty of Agriculture, Hokkaido University,
N9, W9, Sapporo, 060 Japan*

^{††}Present address : *Plant Biotechnology Institute, Ibaraki,
Ago, Iwama, Nishiibaraki, 319-02 Japan*

Melon shoot primordia were induced from shoot apex with 2-3 leaf primordia by slanting rotary culture (2rpm) under conditions of continuous light (aprox. 3000 lux). Shoot primordia were induced most effectively on the MS liquid media containing 0.5-4.0 mg/l 6-benzyladenine (BA) and 0.01 mg/l naphth-arenetic acid (NAA). They were easily subcultured in the MS liquid medium with 1 mg/l BA under the same conditions as the initial culture at an interval of 2-3 weeks. Shoot primordia easily developed shoots

on the MS gelatin gum media containing 0.1-0.4 mg/l BA and regenerated plantlets after transferring to the MS hormone free medium. Regeneration potential of subcultured shoot primordia was maintained at a high level, approx. 80~96% on average after one-year. Melon shoot primordia are available in genetic transformation, or micropropagation, etcetera because of their easiness to subculture, and stable regeneration ability.