

## アールスメロンの純系および雑種系統の種子由来 カルスにおける不定胚形成効率の比較

細井好之\*・豊田秀吉\*・野田二美代\*・  
前田和彦\*\*・竹林晃男\*\*・大内成志\*

\* 近畿大学農学部植物病理学研究室  
(〒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)

(1994年2月26日受付)

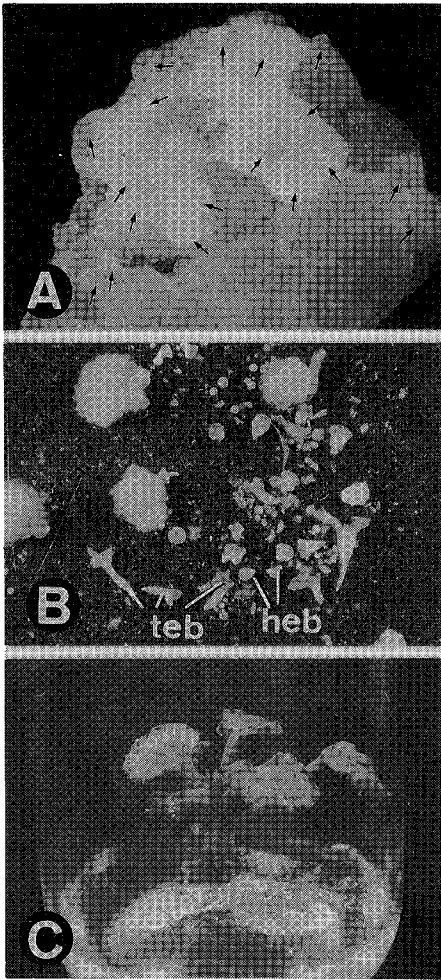
(1994年6月25日受理)

遺伝子工学や細胞工学技術を用いて植物の品種改良を行うにあたっては、使用する植物種について効率的な培養個体再生系を確立することが必須である。筆者らは、すでに、アールスメロンの葉外植片由来カルス<sup>1)</sup>、本葉由来プロトプラスト<sup>2)</sup>、毛状根由来カルス<sup>3)</sup>からの個体再生系について報告したが、これらの最適培養条件は供用する系統によって異なり、メロンの普遍的な個体再生条件を確立するに至っていない。このような問題点を解決するため、本研究では、完熟種子由来カルスから不定胚が比較的容易に形成される特性<sup>4,5)</sup>に注目し、メロンの純系および雑種系統における不定胚誘導効率を比較して、生物工学的研究に適したメロン系統を得ることとした。

本実験には、メロン (*Cucumis melo* L.) の品種 Earl's Favourite の夏1, 夏3, 夏4, 夏6, 夏7 および冬4 の自殖後代とこれらの系統を交配して得た雑種第1代を使用し、完熟種子から不定胚を誘導した。不定胚の誘導は Kageyama らの報告<sup>4)</sup>に従った。すなわち、種皮剝離した種子を表面滅菌(70% エタノールに1分間, Tween-20 を数滴加えた1%の次亜塩素酸ナトリウムに3分間浸漬)し、滅菌水で数回洗浄した後、2 mm 幅に細断して Murashige-Skoog (MS)<sup>6)</sup> (pH 5.7) 液体培地に浸漬した。MS 培地には、4  $\mu\text{g/ml}$  の 2,4-D と 0.1  $\mu\text{g/ml}$  の 6-benzylaminopurine を添加し、シヨ糖濃度を3% (w/v) とした。Kageyama ら<sup>4)</sup>によれば1  $\mu\text{g/ml}$  の2,4-

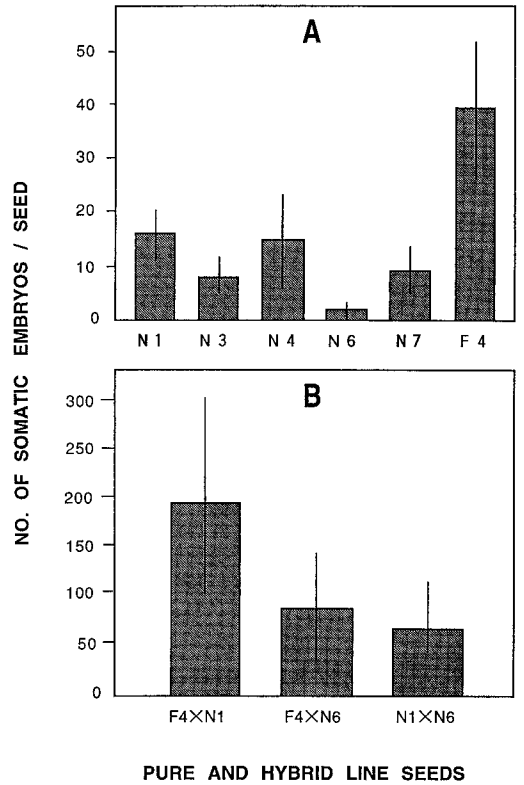
-D が最適であるとしているが、筆者らの予備試験から、4  $\mu\text{g/ml}$  の2,4-D を使用した場合に、本研究に供試した系統(冬4)においてもっとも高い不定胚誘導効率を得られたことから、この濃度の2,4-D を以後の実験に用いた。このようにして調製したMS培地(10 ml)を50 ml の三角フラスコに入れ、容器あたり1粒の種子を浸漬して、26°C, 3,000~4,000 lux の全日長照明下で一定期間回転培養(66 rpm)した。

Fig. 1 には、冬4における不定胚誘導とその分化過程を示す。本研究の培養条件下では、培養開始後3~4日で種子断面に淡黄色のカルスが誘導され、以後活発に増殖して、培養10~12日後にはカルス組織に多数の球状胚が形成された(Fig. 1-A)。このような球状胚は回転培養する過程で容易に培地中に遊離し、一部は心臓型胚を経由して魚らい型胚に分化した(Fig. 1-B)。このような完熟種子からのカルス誘導は使用したすべての系統で観察され、その増殖度についても系統間差は認められなかった。そこで、以後の実験では、カルス組織からの不定胚形成効率を系統間で比較することにした。供試系統の中では、冬4がもっとも高い不定胚形成能を示し、その1種子あたりの平均不定胚数は最低値を示した系統(夏6)の約20倍であった(Fig. 2-A)。アールスメロンの場合、一般に、雑種強勢(heterosis)が発現しやすいと考えられており、実際の栽培においても種々の系統を組合せたF<sub>1</sub>が育成され、品質特性の優れた果実の作出



**Fig. 1** Somatic embryogenesis and plant regeneration from calli derived from mature seed of a melon pure line, Fuyu 4. A, Globular-stage embryos (arrows) produced in callus tissues which had been derived from mature seeds during rotary culture in MS medium containing  $4 \mu\text{g}/\text{ml}$  2, 4-D and  $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$  BAP (12 days after incubation); B, Heart-stage (heb) and torpedo-stage (teb) embryos released into MS medium by rotary shaking (25 days after incubation); C, A plantlet regenerated from somatic embryo (30 days after transfer to hormone-free MS medium).

に貢献している<sup>7)</sup>. このような効果が不定胚形成能についても認められるかどうかを調べるため、供用系統の中から、冬4(不定胚形成能が最高値の系統)、夏1(中程度の系統)、夏6(最低値の系統)の3系統を選び、これらのF<sub>1</sub>雑種を得て、上記と同様の実験を行った。その結果、いずれのF<sub>1</sub>雑種においても不定胚数が増え、不



**Fig. 2** Embryogenesis in mature seed-derived calli of pure (A) and hybrid (B) lines of melon.

Each of 25 seeds of six pure lines, Natu 1 (N1), Natu 3 (N3), Natu 4 (N4), Natu (N6), Natu 7 (N7), and Fuyu 4 (F4) or hybrid lines was cultured in MS medium containing  $4 \mu\text{g}/\text{ml}$  2, 4-D and  $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$  BAP on a rotary shaker, and the number of somatic embryos released in a medium was counted after 3 weeks of incubation. Bar represents the range between the highest and lowest numbers of globular-stage embryos.

定胚形成に雑種強勢効果の存在することが確認された。特に、冬4と夏1を交配したF<sub>1</sub>雑種においては、その効果が相乗的であって、不定胚数が冬4の約5倍に達した(Fig. 2-B)。

不定胚から再生個体を得るにあたっては、誘導された球状胚をホルモン無添加MS培地に移植した。その結果、純系、雑種系統のいずれにおいても、ほとんどすべての胚(置床した球状胚の約80%以上)からFig. 1-Cに示すような再生個体が得られ、それ以後の生育を停止したり、奇形を呈する異常胚は20%以下であった。なお、上記の2, 4-D添加培地で球状胚の培養を継続した場合には、形成された魚らい型胚のほとんどすべてが奇

形化または生育を停止した。

以上のように、筆者らは、アールスメロンの冬4と夏1のF<sub>1</sub>雑種を使用することによって、種子カルスから高率に体細胞胚を誘導し、最終的には多数の再生個体を得ることができていることを明らかにした。このような効率的な個体再生系はアグロインフェクション法やショットガン法による遺伝子導入実験、薬剤耐性などの体細胞変異選抜実験などに適用することが可能であり、メロンの生物工学研究に優れた実験系を提供するものと考え、カルス誘導能や個体再生能の遺伝学的解析は主にイネ科植物を中心に報告されており、複数の遺伝子が関与するとされている<sup>8)</sup>。アールスメロンの場合、その遺伝子解析は行われていないが、本研究の結果は不定胚形成に何らかの遺伝子が関与し、また、それらの遺伝子が系統間で異なることを示唆するものと考えた。

なお、本研究は1993年度日本私学振興財団ならびに

近畿大学環境科学研究所の助成金によるものである。

## 文 献

- 1) 豊田秀吉, 茶谷和行, 清水邦彦, 前田和彦, 竹林晃男, 宗 英凱, 大内成志, 1987. 植物組織培養, 4: 8-12.
- 2) 豊田秀吉, 細井好之, 前田和彦, 竹林晃男, 中東 豊, 大内成志, 1991. 植物組織培養, 8: 118-120.
- 3) 豊田秀吉, 細井好之, 山本明子, 西口 勉, 前田和彦, 竹林晃男, 大内成志, 1991. 植物組織培養, 8: 21-27.
- 4) Kageyama, K., K. Yabe, S. Miyajima, 1991. Japan J. Breed., 41: 273-278.
- 5) Homma, Y., K. Sugiyama, K. Oosawa, 1991. Japan J. Breed., 41: 543-551.
- 6) Murashige, T., F. Skoog, 1962. Physiol. Plant., 15: 473-497.
- 7) 瀬古龍雄, 1989. 野菜園芸大百科4 メロン・スイカ (農文協編), p. 117-157, 農山漁村文化協会, 東京.
- 8) Rakocy-Trojanowska, M., S. Malepszy, 1993. Theor. Appl. Genet., 86: 406-410.

## Summary

### Comparison of Somatic Embryogenic Capabilities between Calli Derived from Pure and Hybrid Line Seeds of Melon (*Cucumis melo* L. cv. Earl's Favourite)

Yoshiyuki HOSOI\*, Hideyoshi TOYODA\*, Fumiyo NODA\*, Kazuhiko MAEDA\*\*, Teruo TAKEBAYASHI\*\* and Seiji OUCHI\*

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

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

The efficiency of somatic embryogenesis in calli derived from mature seeds was compared with 6 pure lines and 3 hybrid lines of melon (*Cucumis melo* L. cv. Earl's Favourite). Each of 25 seeds of these melon lines was cut into segments and separately cultured on a rotary shaker in a liquid MS medium containing 4 µg/ml 2, 4-D and 0.1 µg/ml BAP. Calli were induced at the cut-surface of seeds 3-4 days after incubation, and globular-stage embryos were produced in callus tissues of all melon lines used after 3 weeks of incubation. The highest production of the embryos was observed in the pure line, Fuyu 4. The embryo production was considerably higher in the hybrid line between Fuyu 4 and Natu 1, compared with those of respective pure lines. These somatic embryos were successfully regenerated into intact plants 30 days after transfer to a hormone-free MS medium.