

一般報文

メロンの薬培養による小孢子からの
dihaploid plant の誘導

藤下典之・柴田哲生

大阪府立大学農学部
(〒591 堺市百舌鳥梅町4-804)
(1991年2月8日受付)
(1991年3月25日受理)

メロンで小孢子起源の植物誘導を目的に薬培養を試みた。誘導植物の起源が証明できるように、温室メロン 'Earl's Favourite' の1遺伝子で劣性形質を示す無毛系統に、有毛系統を交配して得た F_1 雑種の薬を培養材料とした。NAA 10^{-6} M, BA 10^{-6} M, グルタミン 800 mg/l, スクロース 100 g/l, ジェランガム 2.5 g/l を含む MS 培地上で、9個の embryoid とカルスが形成された。これらの embryoid から3個体の有毛植物が誘導され、うち1個体は枯死したが2個体が開花し、花粉稔性は85%以上あった。誘導植物に自家受粉と無毛系統による戻し交配を行ったところ、多数の充実種子が得られ、高い種子および花粉稔性ことから、誘導植物は2倍体と推察された。自家受粉と戻し交配で得た5果からの547本の幼苗は、すべてが有毛で無毛植物が分離・出現しなかったので、誘導植物は小孢子起源であることが証明され、培養過程における染色体の倍加で生じた dihaploid plant と考えられた。

1. 緒言

半数性細胞からの植物誘導は、有用な劣性形質の発現を早めかつ高め、純系の育成年限が短縮でき、自家不和合性の強い植物でもホモ個体が得られるなどの見地から有用である。

薬培養による半数性細胞からの植物誘導は、チョウセンアサガオ^{1,2)}以来、ナス科^{3,4)}・アブラナ科⁴⁾・イネ科^{5,6)}植物で多くの成功例があり、実用品種の育成に貢献している。しかし、供試植物の科、属、種あるいは品種によって誘導の成否が著しく異なるほか、外植体の age、アルビノの出現など問題が山積しており、安定した培養系の確立が強く囑望されている。

再分化能が低いとされてきたメロン・キュウリ・スイカ・カボチャなどのウリ科植物の薬培養では、メロン^{7,8,9)}・キュウリ^{10,11)}・スイカ^{10,12)}でのカルスと植物、カボチャでのカルス¹⁰⁾誘導などが報告されている。

筆者らは、*Cucumis* 属植物での小孢子起源の植物誘導を目的に薬培養^{8,9)}を試みてきた。*Cucumis* 属植物の薬培養で植物体を誘導した報告例には、前記のキュウ

リ¹¹⁾・メロン^{8,9)}があるが、誘導された植物体の起源が前者では不明であり、後者では薬壁組織のカルスからであって、小孢子起源の植物誘導はまだ成功していない。ここでは、メロンで小孢子起源の植物が誘導できたので報告する。

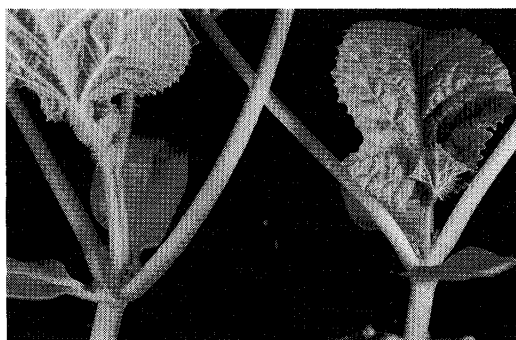


Fig. 1 Normal (left) and glabrous (right) melon plants.
Note smooth surface on stem, petiole and leaf-blade in the right.

2. 材料および方法

誘導植物の起源が早期に証明できるよう、温室メロン 'Earl's Favourite' の F_1 雑種植物の薬を用いた。これは、1 遺伝子の突然変異によって劣性形質を示す無毛系統 (glabrous, glgl) の除雄した両性花に、有毛系統 (normal, ++) の花粉を交配し、雑種になっていることを確認したものである (第 1 図)。四分子からその直後の小孢子の発育段階 (蕾の大きさ: 2.5~3.0 mm) にある蕾を、70% エタノールで 10 数秒間、Tween 20 (相当品) を滴下した有効塩素 1% アンチホルミンで 20 分間表面殺菌し、滅菌水で 3 回洗浄したのち薬を無菌的に取り出し培養した。

培地は MS を基本とし、それに NAA, BA, グルタミン、アスパラギン、イノシトール、セリン、カザミノ酸、スクロースを種々の濃度で添加したのち、ジェランガムを 0~10 g/l 加え pH を 5.7 に調整した。ガラス管ビン (30×100 mm)、シャーレ (15×90 mm)、三角フラスコ (100 ml) に培地を分注した後、120°C、1.2 気圧のオー

トクレープで 20 分間滅菌した。液体培地には、処理の一部としてキュウリとメロンの受粉後 1~15 日の未熟果の胎座切片を 1~4 枚添加した。キュウリの胎座切片には単為結実性のある F_1 ['夏節成'×KUD-1] の自然単為結実果を用い、メロンの材料には単為結実性のない 'Earl's Favourite' の系統間 F_1 雑種である G・NE (本報の薬培養と同材料) の自家受粉果、単為結実性のある No. 111 の自家受粉果、および G・NE と No. 111 の交雑受粉果を供試した。胎座切片の添加方法は、1.5~2 mm の厚さに輪切りにした子房から胚珠を胎座ごとコルクボーラーで打ち抜き、薬とともに培養するものである。

ガラス管ビンでは 20 ml の培地に 3 花の薬を、シャーレでは 30 ml の培地に 10~20 花の薬を、三角フラスコでは 20 ml の培地に 3~10 花の薬をそれぞれ置床した。培養は、25°C、2000~4000 lux の 12 時間照明の培養器内で行った。慣行より短い照明時間としたのは、長日による花芽形成の抑制を考慮してのことである。

培養開始後、形成した embryoid は薬からとりはずし、

Table 1. Effects of medium composition on the formation of embryoids, small leaves and calli in cultured anthers of *Cucumis melo*

compositions ^a						No. of anthers inoculated	No. of anthers forming		
suc g/l	gel g/l	Glu mg/l	Asp mg/l	Ser mg/l	CH mg/l		embryo- oids	small- leaves	calli
100	2.5	—	—	—	—	90	0	1	1
200	2.5	—	—	—	—	90	0	0	0
300	2.5	—	—	—	—	90	0	0	0
50	2.5	800	—	—	—	90	0	3	0
100	2.5	800	—	—	—	90	1 ^b	1	3 ^b
100	5.0	800	—	—	—	186	0	1	0
100	10.0	800	—	—	—	199	0	0	1
200	2.5	800	—	—	—	90	0	0	0
50	2.5	—	1000	—	—	533	0	8	0
100	2.5	—	1000	—	—	90	0	0	0
200	2.5	—	1000	—	—	90	0	0	0
50	2.5	800	1000	—	—	222	0	3	0
75	2.5	800	1000	—	—	167	0	2	0
100	2.5	800	1000	—	—	245	0	4	1
200	2.5	800	1000	—	—	90	0	0	0
50	2.5	800	—	100	1000	149	0	6	0
50	5.0	800	—	100	1000	143	0	2	0
50	10.0	800	—	100	1000	154	0	2	0
100	2.5	800	—	100	1000	195	0	4	0
100	5.0	800	—	100	1000	195	0	2	0
100	10.0	800	—	100	1000	183	0	1	0

Basal medium was MS salts with 10^{-6} M NAA and 10^{-6} M BA, pH 5.7.

Data taken at 60 days after inoculation.

^a suc: sucrose, gel: gellan gum, Glu: glutamine, Ser: serine, Asp: asparagine, CH: casamino acids

^b 9 embryoids and a callus were initiated from the same anther.

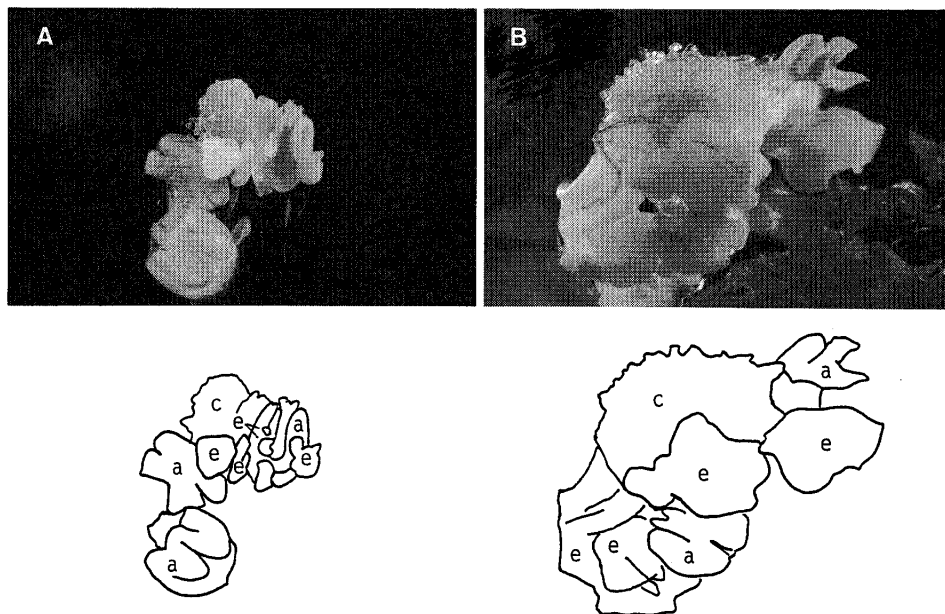


Fig. 2 Embryoids and calli formation from an anther inoculated onto MS medium containing 10^{-6} M NAA, 10^{-6} M BA, 800 mg/l glutamine, 100 g/l sucrose and 2.5 g/l gellan gum. The anther was cultured when the microsporocytes were at the pollen tetrad to uninucleate stage. Photographs taken at 45 (A) and 54 (B) days after inoculation for the same anther. e: embryo, c: callus, a: anther

葉状組織（不定形の小型の葉に見える組織）は葯からとりはずさないで、それぞれ plantlet 誘導用培地につづつ移植した。plantlet 誘導用培地は、1/2 MS にスクロース 20 g/l、ジェランガム 2~2.5 g/l を加え、pH を 5.7 に調整した生長調節物質無添加の培地である。これをガラス管ビン（30×100 mm）に 20 ml ずつ分注し、オートクレープで滅菌した。

移植後、シュートと根を分化して plantlet に发育したものを、オートクレープで滅菌したパーミキュライト入りのプラスチック製容器に無菌的に移植し、ハイポネックス 1000 倍溶液を与えて馴化した。本葉が 15 枚程度展開したとき、温室のれき耕ベッドに定植した。

誘導植物の花粉は、開花当日の午前中にアセトカーミンで染色し、湿らせたろ紙を入れたシャーレ内に室温で 30 分間放置してから検鏡した。花粉稔性は、花粉の細胞質が完全に均一に染色される充実花粉、不均一に染色される充実不全花粉、全く染色されない空虚花粉に分けて数え、 $[(\text{充実花粉数}/\text{検鏡花粉数}) \times 100 (\%)]$ で算出した。

誘導植物は、自家受粉と無毛系統 (glabrous) による戻し交配とを行い、次代実生の毛の有無の分離を確かめて、その起源を明確にしようとした。その方法は、株・果実別に採種した充実種子全粒を、バット内に十分に湿

らせた厚手の布を敷いて播種し、発芽 3~5 日後の幼苗の子葉、胚軸について毛の有無を調査するものであった。

3. 実験結果

MS 無機塩類とスクロースのみの培地では、黄緑色であった葯が、培養開始後 10 日頃から白変しはじめ、一部に褐変がみられるものもあり、embryoid もカルスも形成しなかった。

液体培地にキュウリの単為結実果の胎座切片を添加しても、葯にはなんら影響が認められなかった。また、メロン G・NE の自家受粉果の胎座切片を添加したものでは、いずれも葯は置床後 10~20 日で白変していた。一方、同じ G・NE に No. 111 の花粉を交配した受精胚を内蔵する胎座切片を添加すると、無添加に比べて葯の黄化の速度が緩慢となった。しかし、置床 90 日後には黄変・褐変あるいは白変していた。培地量を 5, 10, 20 ml と差をつけて、No. 111 の自家受粉果の胎座切片を同量添加したとき、培地量の少ないもののほど葯の黄化の速度が緩慢となったが、置床 90 日後には黄変・褐変あるいは白変していた。

いずれの胎座切片添加処理でも、培養葯からの embryoid およびカルス形成は認められなかった。液体培地への胎座切片添加効果は、メロン受粉果を供試したと

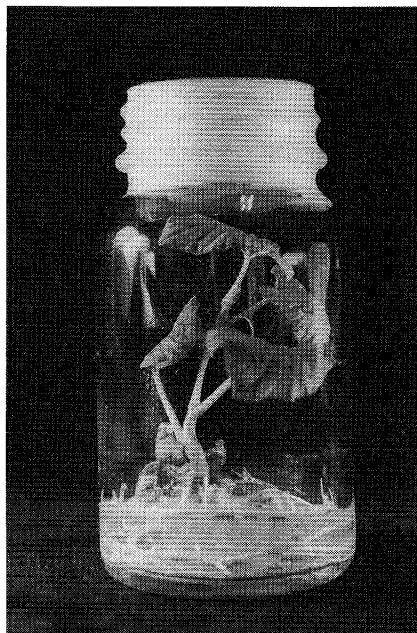


Fig. 3 Anther culture-induced plant (88AC1) growing on plantlet-inducing medium.

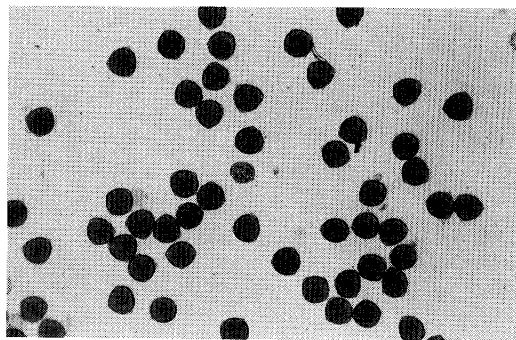


Fig. 4 Pollen grains of an anther culture-induced plant (88AC1, di-haploid). Pollen fertility showed above 85%.

き、葯の緑色保持期間が延長されるにとどまった。

NAA 10^{-6} M, BA 10^{-6} M, グルタミン 800 mg/l, スクロース 100 g/l を添加した培地で、1本の葯からカルスが置床 20 日目の観察時に認められ、9個の embryoid が置床 50 日目の観察時に認められた (第1表, 第2図)。これらの embryoid を置床 63 日目に plantlet 誘導用培地に移植した (第3図)。正常な本葉が5枚程度展開し十分発根もみられた移植後 229 日目に、滅菌済みのパーミキュライトをいれた馴化用のプラスチック製容器に無菌的に移植した。正常に発育した3個体 (以下、それぞれ 88AC1, 88AC2, 88AC3 と呼ぶ) はすべて有毛

で、本葉が15枚程度展開した馴化開始 23 日目に、温室のれき耕ベッドに定植したが1個体 (88AC3) は枯死した。2個体 (88AC1, 88AC2) は、両親に比べやや弱勢であったが、順調に発育を続け雄花が次々に開花し、花粉稔性は 85~88% を示した (第4図)。この有毛形質を示した2個体には、定植後約 30 日目にそれぞれ自家受粉と無毛系統の戻し交配を行い、約 60 日後に多数の充実種子を含む果実が5個得られた。培養開始から果実収穫までの所要日数は、約 410 日であった。これらの次代幼苗の毛の有無を調査したところ、自家受粉 (3果)、戻し交配 (2果) に関係なく、無毛の個体は1個体も出現せず 547 個体すべてが有毛で、形質の分離は認められなかった (第2表, 第5図)。

葉状組織は、生長調節物質を含む数種の培地で、カルス形成をとまなうことなく置床後 20~60 日の間に形成された (第1表, 第6図)。いずれの組織から形成されたかは不明であり、40 個体すべてを葯ごと plantlet 誘導用培地に移植したが、根もシュートも形成せず枯死し

Table 2. Segregation of characters with maker gene in progenies from selfed and back-crossed inducing plants.

Mode of pollination in induced plants	No. of seedlings observed/fruit		Theoretical ratio			
			MS		AW	
	N	G	N	G	N	G
88AC1 'normal' self	58	0	∞	0	3	1
88AC1 'normal' self	157	0	∞	0	3	1
88AC1 'normal' $\times$ 'glabrous'	184	0	∞	0	3	1
88AC2 'normal' self	134	0	∞	0	3	1
'glabrous' $\times$ 88AC2 'normal'	14	0	∞	0	1	1

N: normal

G: glabrous

MS: Microspore origin

AW: Anther Wall origin

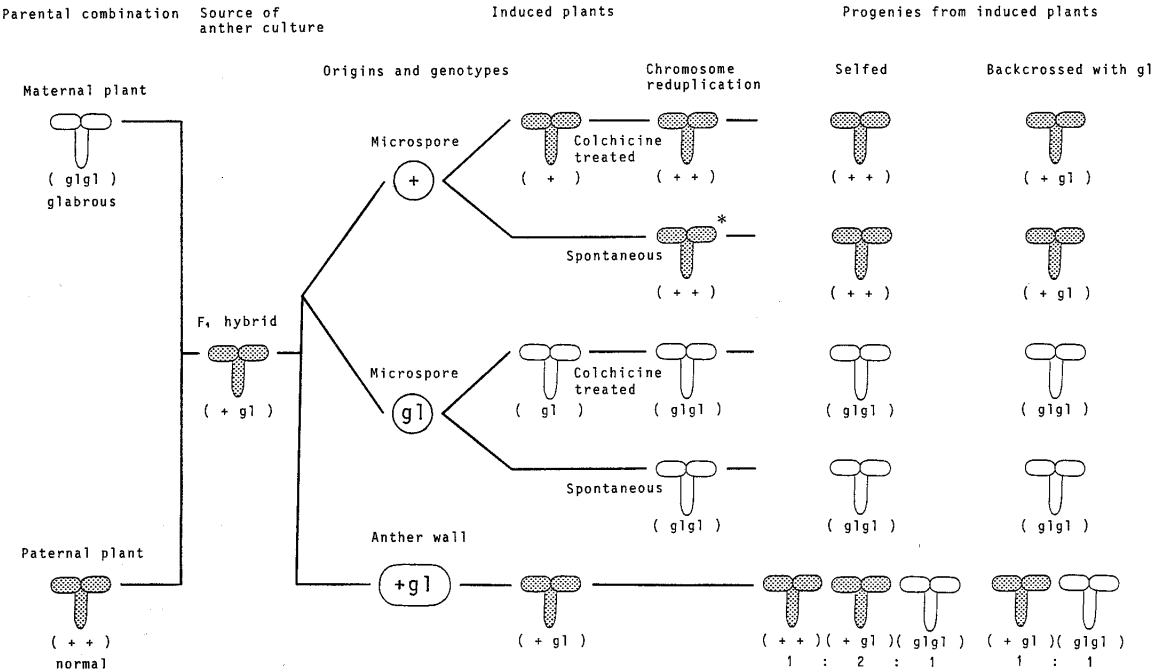


Fig. 5 Schematic-illustration of the origin of plant induced through anther culture in *Cucumis melo*.
* : Induced dihaploid plants through spontaneous chromosome reduplication in process of the present anther culture.

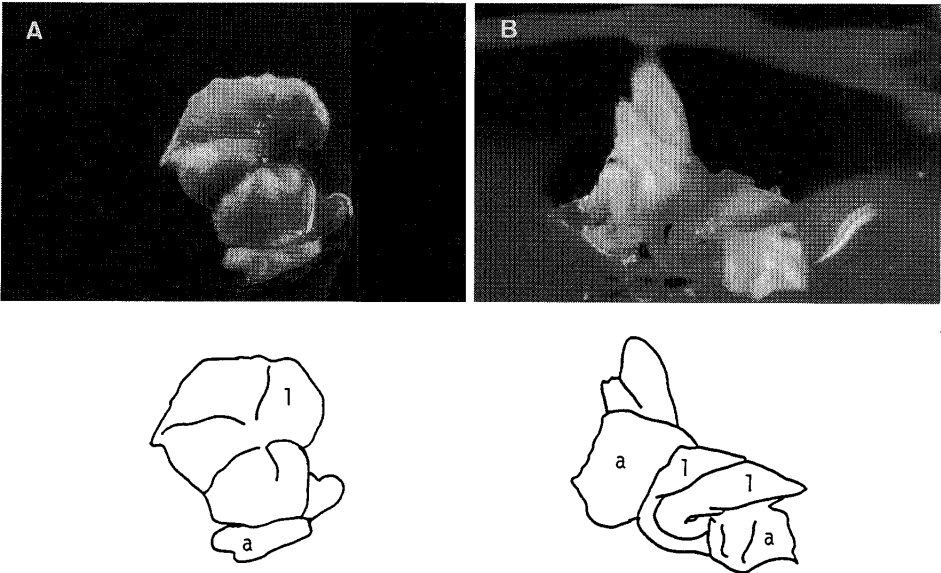


Fig. 6 Formation of leaf-like tissues from anthers inoculated on embryoid-inducing medium. Leaf-like tissues were formed on anther(A) or inside of medium from anther(B). They formed neither shoot nor root on plantlet-inducing medium. The origin of them was not determined. Photographs taken at 19(A) and 29(B) days after inoculation.
a: anther, l: leaf-like tissue

た。

4. 考 察

今回の培養材料から誘導されると考えられる植物には、+ または gl の遺伝子を持つ小胞子を起源とする normal または glabrous の植物と、+gl の遺伝子を持つ薬壁や花糸あなどを起源とする normal の植物とがある。したがって、培養薬から無毛の植物が出現すれば、それは小胞子起源 (gl) であることが培養容器内の plantlet の段階で早期に確認できる。一方、有毛の植物が出現すれば、自家受粉や無毛系統 (glgl) の戻し交配を行って採種した種子を播き、発芽後 3~5 日の幼苗段階の毛の有無を観察することにより、誘導植物の起源を明確にすることができる。

今回誘導された植物は 3 個体とも有毛であり、開花結実に至った 2 個体は、染色体の観察はできなかったものの、花粉稔性が高かったこと¹³⁾と自家受粉および戻し交配で充実種子が十分に得られたことから 2 倍体と推察された。誘導当代の植物を調査した時点では、+ の遺伝子を持つ小胞子起源であるが、培養過程で染色体が自然倍加したものであるのか、+gl の遺伝子を持つ薬壁や花糸あと起源であるのかは決定できない。もし、有毛の誘導植物が小胞子起源であれば、自家受粉や無毛系統の戻し交配を行うと次代植物の遺伝子型は、それぞれ、++ と +gl のみとなり、表現型はいずれも全個体が有毛を示すことになる。一方、薬壁や花糸あと起源であれば、自家受粉や戻し交配を行うと次代植物の遺伝子型は、それぞれ ++ : +gl : glgl = 1 : 2 : 1 と +gl : glgl = 1 : 1 となり、表現型は有毛と無毛が、3 : 1 と 1 : 1 に分離することになる (第 5 図)。

誘導植物の自家受粉と無毛系統の戻し交配で得られた幼苗は、自家受粉、戻し交配にかかわらず全て有毛で、無毛個体の出現・分離は認められなかった。したがって、今回の薬培養による誘導植物は、小胞子起源であることが直接証明され、それが培養過程で染色体倍加を起こしたものと考えられた。メロンやキュウリなどの *Cucumis* 属植物では、染色体の自然倍加の例が数多く報告されている。なかでも培養過程における倍加が多く、キュウリの子葉カルス¹⁴⁾、メロンの薬壁カルス^{8,9)}、キュウリの胎座切片培養¹³⁾、メロンの不定胚培養¹⁵⁾などでは 4 倍体が、無受粉のメロンの胎座切片培養¹⁶⁾では 2 倍体が報告されており、コヒメウリ (*C. melo* var. *hime*) での 4 倍体メロンの花粉や異種花粉の受粉による無配偶生殖¹⁷⁾では、2 倍体の出現が報告されている。また、温室栽培条件下でメロン¹⁸⁾や *C. figareii* (未発表) に 4

倍体が自然発生している。培養過程での染色体の自然な倍加は、コルヒチン処理による染色体の倍加操作を省くことができ育種上好都合である。なお、薬からの embryoid 形成過程の組織学的観察も興味深いが、その知見はあくまでも誘導植物の起源の間接的な傍証の域をでるものではなからう。

植物の誘導できた培地には、グルタミン 800 mg/l、スクロース 100 g/l が添加してあったが、タバコの花粉からの embryoid 形成にはアミノ酸が必要で、アミノ酸のうちグルタミンとアスパラギンが有効¹⁹⁾とされており、アブラナ科の薬培養ではスクロースの高濃度が有効²⁰⁾とされている。今回の結果もこれらに類似するものであるかもしれない。

薬培養による小胞子起源の植物の誘導経路としては、ナス科やアブラナ科の一部のものに見られるように、小胞子から直接 embryoid を形成する経路と、イネ科をはじめとする多くの科や種で見られるように、小胞子があったんカルス化し、それから再分化してくる経路とがある^{4,21)}。今回の誘導植物の場合は、1 本の薬から、まず、カルスが観察され、ついで、9 個の embryoid の形成が観察されたが、embryoid が小胞子から直接形成したものか、小胞子起源のカルスから分化したものか判別できなかった。

一方、葉状組織を形成したすべての薬で、カルス形成は全く認められなかった。これらの葉状組織から再分化個体が得られていないので、その起源が、小胞子であるのか薬壁あるいは花糸あなどの母体組織であるのかは不明である。近年 *Cucumis* 属においても子葉^{14,22,23,24)}や葉^{25,26)}などの外植体から、培養による植物再生が数多く成功しているので、これらの技術を応用することにより、葉状組織からの再分化植物を得ることも可能であると考えられる。

MS 無機塩類にスクロースのみを添加した液体培地で、薬をキュウリやメロン果実の胎座切片とともに培養すると、embryoid やカルス形成は認められなかったものの、胎座切片を含まない液体培地に比べ薬の緑色保持期間が延長された。キュウリやメロンの未熟胚からの植物誘導に胎座切片培養は有効¹³⁾であったが、今回の薬培養では胎座切片の添加効果は少なく、使用する植物の種類、品種、受粉後の日数、添加量などに検討が必要であろう。

今後は、embryoid の誘導頻度の向上、葉状組織からの植物誘導および両者の形成過程の組織学的観察を試みたい。

文 献

- 1) Guha, S., S. C. Maheshwari, 1964. Nature, **204**: 497.
- 2) Guha, S., S. C. Maheshwari, 1966. Nature, **212**: 97-98.
- 3) 中田和男, 田中正雄, 1968. 遺伝学雑誌, **43**: 65-71.
- 4) 大澤勝次, 1986. 育種学最近の進歩, **27**: 19-32.
- 5) Hu, H., 1985. Use of haploids in crop improvement in China., Genetic Manipulation in Crops Newsletter, **1**: 11-23.
- 6) 新関宏夫, 1979. 組織培養, **5**: 335-338.
- 7) Dryanovska, A. O., I. N. Ilieva, 1983. Comptes Rendus de l' Académie Bulgare de Sciences, **36**(8): 1107-1110, cited from Plant Breed. Abst. 1985. **55**(1): 66(646).
- 8) 藤下典之, 古川 一, 1983. 園学要旨, 昭和 58 秋: 162-163.
- 9) 藤下典之, 古川 一, 1985. 園学要旨, 昭和 60 秋: 170-171.
- 10) Dryanovska, A. O., 1985. Comptes Rendus de l' Académie Bulgare des Sciences. **38**(9): 1243-1244, cited from Plant Breed. Abst. 1987. **57**(1): 79(737).
- 11) Lazarte, J. E., C. C. Sasser, 1982. HortScience, **17**: 88.
- 12) Xue, G. R., W. Y. Yu, K. W. Fei, 1983. Zhiwu Shenglixue Tongxun (Plant Physiology Communications), cited from Plant Breed. Abst., 1984. **54**(12): 931(9243).
- 13) 藤下典之, 斎藤清子, 1990. 植物組織培養, **7**: 23-30.
- 14) Kim, S. G., J. R. Chang, H. C. Cha, K. W. Lee, 1988. Plant Cell Tissue Organ Cult., **12**: 67-74.
- 15) 江面 浩, 雨ヶ谷洋, 吉岡啓子, 大澤勝次, 1990. 育種学雑誌, **40** 別冊 **2**: 68-69.
- 16) 藤下典之, 西谷勝美, 西井克美, 1989. 育種学雑誌, **37** 別冊 **2**: 18-19.
- 17) 藤下典之, 中川啓子, 1974. 花粉, **6**: 34-36.
- 18) 鈴木英治郎, 1958. 静岡大学教育学部研究報告, **9**: 169-176.
- 19) Aruga, K., T. Nakajima, 1985. Jpn. J. Breed., **35**: 127-135.
- 20) Keller, W. A., T. Rajhathy, J. Lacapra, 1975. Can. J. Genet Cytol., **17**: 655-666.
- 21) 有賀小海, 1986. 育種学最近の進歩, **27**: 33-41.
- 22) Cade, R. M., Todd C. W., Frank A. B., 1990. J. Amer. Soc. Hort. Sci., **115**(4): 691-696.
- 23) Gambley, R. L., W. A. Dodd, 1990. Plant Cell Tissue Organ Cult., **20**: 177-183.
- 24) Punja, Z. K., N. Abbas, G. G. Sarment, F. A. Tang, 1990. Plant Cell Tissue Organ Cult., **21**: 93-102.
- 25) Malepszy, S., A. N. Orczyk, 1983. Z. Pflanzenphysiol., **111**: 273-276.
- 26) Malepszy, S. 1988. Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Biotechnology in Agriculture and Forestry vol. **6**. (ed. by Y., P. S. Bajaj) Springer-Verlag, 277-293.

Summary

Induction of Dihaploid Plants from
Microspore through Anther Culture in
Melon (*Cucumis melo* L.)

Noriyuki FUJISHITA and Tetsuo SHIBATA

College of Agriculture, University of Osaka Prefecture, Sakai, Osaka, 591, Japan

Anthers from hybrid plants between glabrous(♀)- and normal(♂)-line in *C. melo* cv. 'Earl's Favourite' were cultured on different media. The glabrous condition is single recessive to normal. Embryoid induction was observed with MS medium containing 10^{-6} M NAA, 10^{-6} M BA, 800 mg/l glutamine, 100 g/l sucrose and 2.5 g/l gellangum. Nine embryoids were subcultured onto plantlet-inducing medium, which consisted of 1/2 strength MS salt supplemented with 20 g/l sucrose and 2 g/l gellangum. The two plants obtained were phenotypically not glabrous and, when transferred to a greenhouse bed, developed into normal mature plants with normal pollen fertility. Self- and back-crossed flowers produced fruit containing many germinable seeds. It was evident that the plants induced through anther culture originated from the microspore, because no segregation was recognized for glabrous/normal in the self- and back-crossed progeny, and they were considered to be dihaploid plants arising through spontaneous chromosome duplication.