

茨城農総セ
生工研研報
Bull. Ibaraki
Plant Biotech. Inst.
No. 1 1995

ISSN 1341-2809

BULLETIN
OF THE
PLANT BIOTECHNOLOGY INSTITUTE
IBARAKI AGRICULTURAL CENTER

NO. 1
February 1995

茨城県農業総合センター
生物工学研究所研究報告

第 1 号
平成 7 年 2 月

茨城県農業総合センター
生物工学研究所

茨城県西茨城郡岩間町安居 3 1 6 5 - 1
Ago, Iwama, Nishi-Ibaraki, Ibaraki 319-02, Japan

メロンの組織培養において出現する体細胞突然変異と その利用に関する研究

江 面 浩

目 次

I 緒 言	1
II 植物体再生のための培養系	2
1 不定芽形成培養系による植物体再生	2
2 不定胚形成培養系による植物体再生	4
3 苗条原基形成培養系による植物体再生	7
4 腋芽伸長培養系による植物体再生	10
III 培養系の違いと体細胞突然変異の出現頻度	12
1 不定胚形成培養系の再生植物体に現れる形態変異と体細胞突然変異を評価する指標	12
2 染色体数変異を指標とした異なる培養系における体細胞突然変異出現の差異	17
IV 倍数性変異の出現機構の解析	19
1 不定芽形成培養系の植物体再生過程における細胞の倍数性変異	19
2 不定胚形成培養系の植物体再生過程における細胞の倍数性変異	23
3 四倍体由来外植片の培養における不定芽および不定胚誘導と植物体再生	26
V 倍数性変異の利用	28
1 組織培養により出現した四倍体の利用による三倍体の作出	28
2 三倍体を利用した異数体の作出	33
VI 体細胞突然変異による低温伸長性個体の選抜	36
1 低温伸長性変異個体の選抜方法	36
2 培養系を利用した低温発芽性個体の選抜	41
3 低温発芽性選抜個体の低温伸長性	45
VII 総合考察	56
VIII 摘 要	57
IX 謝 辞	60
X 引用文献	61
XI Summary	66

I 緒 言

メロンの細胞・組織培養による植物体再生は Tang ら (1980) により初めて報告された。その後研究が精力的に行われ、不定芽形成培養系 (Moreno ら 1985 ; Bouabdallah and Branchard 1986 ; 末松ら 1986 ; Kathal ら 1988 ; Dirks and Buggenum 1989)、不定胚形成培養系 (Young ら 1983 ; Oridate and Oosawa 1986 ; 小川ら 1990 ; Kageyama ら 1990、1991)、苗条原基形成培養系 (永井ら 1989)、プロトプラスト培養系 (山中ら 1990 ; 豊田ら 1991 ; 野村ら 1993)、腋芽伸長培養系 (Ohki ら 1991) など各種の培養系によって植物体再生が可能となっている。特に、不定芽形成培養系、不定胚形成培養系、苗条原基形成培養系および腋芽伸長培養系はネット型メロンからノーネット型メロンに至るまでいろいろな品種・系統に適用可能であり、植物体再生に関しては安定した培養系と考えられる。一方、プロトプラスト培養系は一部の系統でのみ植物体再生が可能であり、更に培養方法の改良が必要である。またプロトプラストからの植物体再生は不定芽経由 (山中ら 1990 ; 豊田ら 1991) または不定胚経由 (野村ら 1993) であり、再生法としては前述の培養系と同じであると考えられる。

これらの培養系は、メロンにおける細胞選抜、細胞融合、外来遺伝子の導入などによる遺伝的な改良や種苗の大量増殖などへの利用が可能であると考えられる。実際に外来遺伝子の導入技術を用いたメロンの遺伝的な改良のために不定芽形成培養系などが利用され始めている (Toyoda ら 1991 ; Yoshioka ら 1992)。

一方、組織培養による再生植物体に体細胞突然変異が高頻度に発生することが報告されている (Larkin and Scowcroft 1981)。それらの変異の中には耐病性に関する形質 (Behnke 1980 ; Simon ら 1987 ; Heath-Pagliuso and Rappaport 1990 ; Toyoda ら 1989、1991 ; Bulk ら 1991)、早晩性などの生態的形質 (江面・雨ヶ谷 1990)、わい性などの形態的形質 (Burg ら 1989 ; Freytag ら 1989 ; Hashim ら 1990)、品質などの生理的形質 (Mathur ら 1988、Kuehnle and Earle 1989 ; Kukreja ら 1991 ; Wang ら 1991) のように育種的に重要な諸形

質に関する有用な変異が含まれており、植物育種における重要な遺伝的変異拡大方法の一つとなっている。体細胞突然変異の出現頻度は、使用する植物体再生のための培養系の違いにより異なると考えられている。茎頂培養は植物体の再生に先だって脱分化 (カルス化) を伴わないため一般に極めて変異発生頻度の低い培養系と考えられており、多くの作物のウイルスフリー化に利用されている。一方、植物体の再生に先だって外植体のカルス化を伴う培養系は変異発生頻度の高い培養系と考えられている。従って、研究の実施においては、体細胞突然変異を利用した細胞選抜では変異出現頻度の高い培養系を選び、外来遺伝子の導入による遺伝的な改良では変異出現頻度の低い培養系を選ぶことが重要となる。

このようなことからメロンの遺伝的改良に各種培養系を利用するうえで、培養系と体細胞突然変異の出現頻度についての関係を明らかにしておくことが極めて重要と考えられる。しかし、前述のようにメロンの細胞・組織培養による植物体再生に関する研究は、1980年代から活発に行われているが、再生植物体の体細胞突然変異に関する研究はほとんど行われていない。

著者はメロンの不定胚から再生した植物体の形態変異の解析を進める中で四倍体が変異個体として高頻度に発生していることを発見した (江面ら 1992)。倍数性変異のような変異は植物体の外部形態に明確に現れるため比較的検出しやすい変異である。また体細胞突然変異は一般的に方向性がなく、いろいろな変異が発生していると考えられている (Larkin and Scowcroft 1981)。従ってメロンの各培養系による再生植物体の倍数性変異の出現頻度を比較することで、各培養系における体細胞突然変異の出現頻度が予測できると考えられる。

本研究では、1) 倍数性変異を指標としたメロンの各種組織・細胞培養系 (不定胚形成培養系、不定芽形成培養系、苗条原基形成培養系、腋芽伸長培養系) における体細胞突然変異の出現頻度の評価、2) 倍数性変異の出現機構の解析、3) 高頻度に出現する倍数性変異の利用、4) 体細胞突然変異を利用した低温伸長性メロンの選抜を行い、メロンの細胞・組織培養による再生植物体に生

じる体細胞突然変異の出現様相を明らかにし、その実用的な有効性を検証した。

II 植物体再生のための培養系

メロンの培養による植物体再生法としては、不定芽形成培養系、不定胚形成培養系、苗条原基形成培養系、腋芽伸長培養系およびプロトプラスト培養系が報告されている。これらの中でプロトプラスト培養系は、プロトプラストからカルスを誘導し不定芽経由で植物体を再生する系とプロトプラストから直接不定胚を誘導し植物体を再生する系の2つが報告されている。従って、プロトプラスト培養系は植物体再生法として更に不定芽形成培養系または不定胚形成培養系に分類される。

細胞・組織培養による植物体再生は、培養に用いた外植体の細胞から直接的に茎頂組織や胚が分化する直接法と、外植体から誘導されたカルスから茎頂組織や胚が分化する間接法の2つに類別される。一般に直接法に比べて、間接法は再生植物体の変異発生頻度が高いと考えられている。従って、細胞・組織培養における形質の変異を考える上では、いずれの培養系によって植物体が再生したかを知ることが極めて重要である。

本章では、メロンの組織培養における植物体再生過程について検討した。

1 不定芽形成培養系による植物体再生

メロン組織の *in vitro* 培養における不定芽経由の植物体再生は、Moreno ら (1985) により初めて報告された。その後、いろいろな系統および外植片から不定芽経由の植物体再生が報告されている (Bouabdallah and Bran-chard 1986 ; 末松ら 1986 ; Kathal ら 1988 ; Dirks and Buggenum 1989) が、いずれもサイトカイニンのみを添加またはオーキシンとオーキシンより高濃度のサイトカイニンとを組み合わせで添加した培地で不定芽を誘導し、その不定芽を生長調節物質無添加の培地で培養してシュートを形成させる方法である。

本節では、本研究の主要材料として用いた茨城県の主要栽培品種から採取した外植片を Dirks and Buggenum (1989) の方法によって培養し、不定芽誘導過程および誘導した不定芽からの植物体再生過程について観察した。

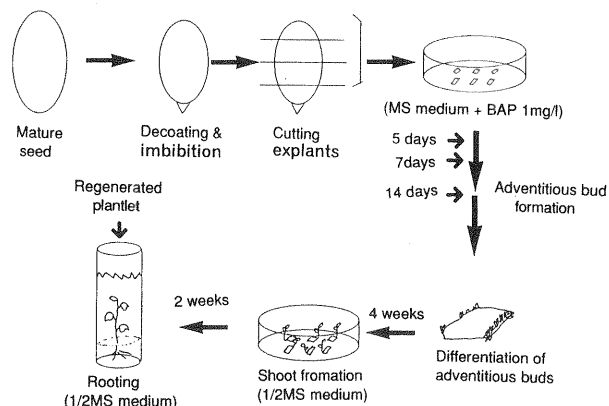


Fig.1. Schematic representation of plantlet regeneration through adventitious shoot organogenesis.

材料および方法

Dirks and Buggenum (1989) が報告している方法の中で完熟種子胚の子葉片を外植片とした方法の一部を改変した不定芽形成法を用いた (Fig. 1)。品種プリンスメロン、アンデス ((株)サカタのタネ) およびアムス (園研) の完熟乾燥種子から取り出した胚を以下の方法で表面殺菌した。即ち、70 % エタノールで 15 秒間、1 % アンチホルミン液で 15 分間殺菌し、滅菌水で 3 回 (5 分/回) 洗浄した。殺菌後、滅菌水中に浸漬して 6 時間吸水させた。吸水した胚から子葉部を取り出して 3 分割し、不定芽形成培地 (MS 培地 + ベンジルアミノプリン (BAP) 1 mg/l + ショ糖 3 % + ゲルライト 0.4 %) に置床した。25 °C、16 時間日長 (白色蛍光灯、3,000 lx) 下で培養し、不定芽形成過程の経時変化を観察した。培養 4 週間後に形成された不定芽について調査した。形成した不定芽は、塊ごと外植片から切り離して 1/2 MS 培地 (無機塩類の濃度を 1/2 とした) に移植した。4 週間培養後、伸長したシュートの計数を行った。シュートは 1 本ずつ切り出し、新しい 1/2 MS 培地に継代培養し、発根させた。

結果および考察

不定芽形成培地上で培養した子葉外植片 (Fig. 2 - A) は、培養開始 3 日後には吸水により肥大し (Fig. 2 - B)、

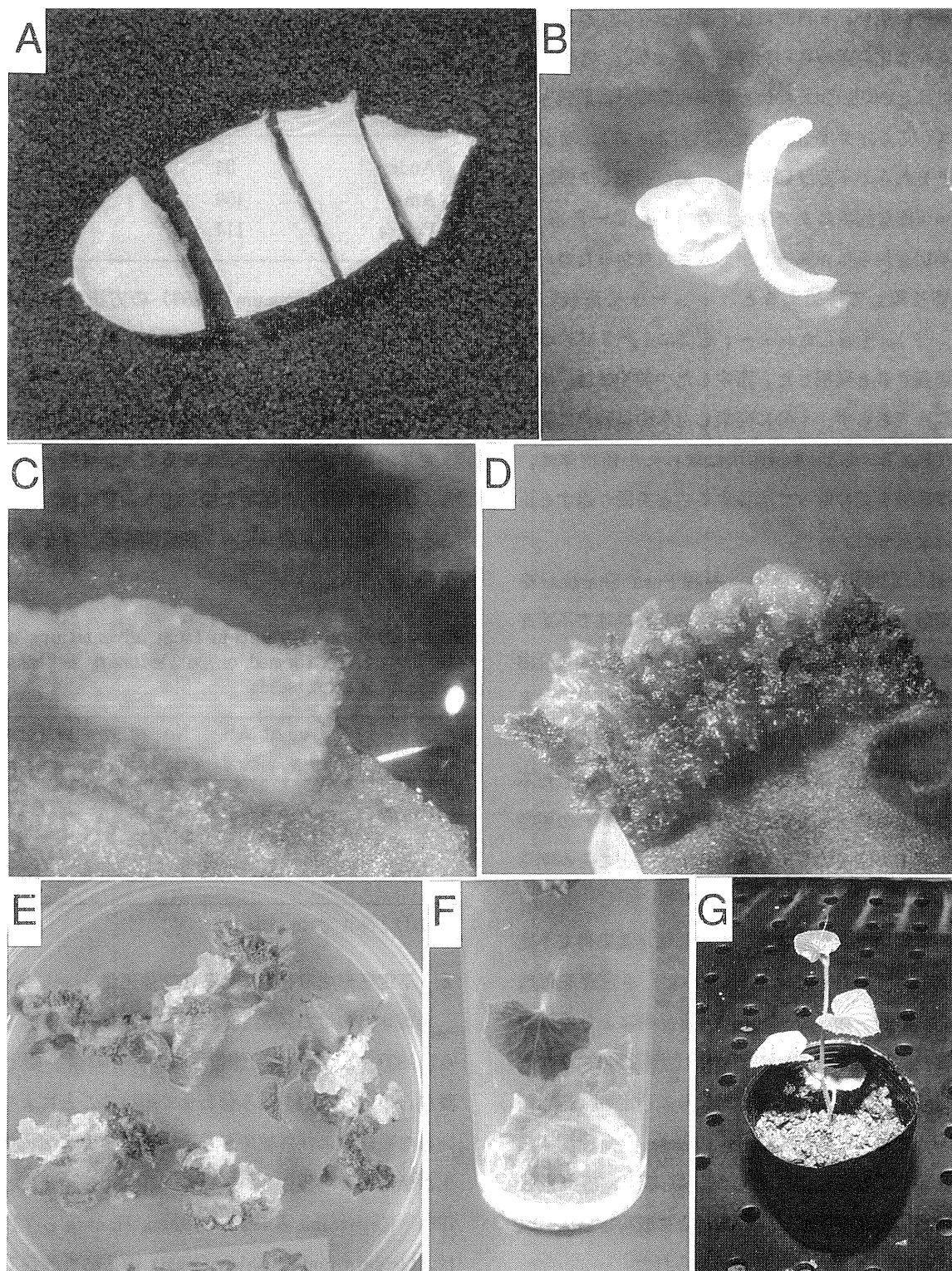


Fig.2. Plantlet regeneration through adventitious organogenesis.
 A, cotyledonary explant ; B, thickening and greening explant after 3 days of culture ;
 C, callus growth at the cut surface of explants after 5 days of culture ; D, differentiating adventitious buds after 2 weeks of culture ; E, growing adventitious buds after 4 weeks of culture ; F, shoot formation from the adventitious bud ; G, acclimatized plant.

同時に緑化が始り、5日後には子葉外植片の切断面が肥厚してカルス化が認められた (Fig. 2-C)。更に、2週間後にはその切断面または維管束組織部分に形成されたカルスから不定芽が分化した (Fig. 2-D)。培養を続けるとそれらの不定芽は発育し、葉が展開して肉眼でも確認が可能な程度にまで生長した (Fig. 2-E)。分化した不定芽からはシュートが形成されなかったが、不定芽を切り離して移植すると、シュートを形成した (Fig. 2-F)。形成したシュートを更に1/2MS培地で継代培養すると発根した。再生した小植物体は、半透明状になっておらず、十分に発根したものは容易に馴化できた (Fig. 2-G)。半透明状になった小植物体は、その先端部分を切り取って培養することを繰り返すと正常な個体となった。

Kathalら (1988) は、メロン品種 Pusa Sharbati を用いた実験で、BAPと2iPを添加した培地で不定芽を誘導しているが、この場合不定芽の分化はカルス経由の間接的な再分化と切断面組織からの直接的な分化であると述べている。しかし、本研究において、明らかにカルスから再分化した不定芽と切断面から直接分化した不定芽とを顕微鏡によって観察したところ、いずれの場合もカルス経由の間接的な不定芽分化であることが明らかとなった。

本実験で用いた3品種では、設定した培養条件で不定芽の形成が可能であった (Table 1)。不定芽を形成した外植片の割合は、62%~80%と品種により差異が認められた。不定芽形成数については品種間に大きな差異は認められなかった。外植片あたりの不定芽形成数は、概ね0~5であった。Niedzら (1989) の播種後4日から7日後の子葉を外植片とした実験では、75%前後の外植片から不定芽を形成させることに成功しているが、形成率は品種間に大きな差異が認められた。

不定芽からのシュート形成は、いずれの品種においても低率であった (Table 2)。しかし、生長調節物質無添加の培地での継代培養を繰り返すと更にシュート形成率は高くなった。このように Dirks and Buggenum (1989) の不定芽形成培養系は、本研究で用いた品種に適用可能であると判断された。しかし、本実験で採用し

Table 1. Adventitious bud (AB) formation from cotyledonary explants of mature seeds

Cultivars	No. of explants cultured	% of explants forming AB
Andes	84	70
Ams	108	62
Prince	114	80

た Dirks and Buggenum (1989) の方法では不定芽からのシュート形成に生長調節物質を使用していないが、Niedzら (1989) の方法では誘導した不定芽をBAP 3 μ Mを添加したMS培地で培養することにより30%の不定芽からシュートを形成させることが可能となっている。本実験で用いた品種についても、更に検討を加えることで不定芽からのシュート形成率を向上させることが可能であろう。

Table 2. Shoot formation from adventitious buds (AB) formed on cotyledonary explants of mature seeds

Cultivars	No. of AB masses cultured	No. of shoots formed	
		after 1 month	after 2 months
Andes	374	1	2
Ams	340	15	3
Prince	35	0	ND*

*ND ; Not detected.

2 不定胚形成培養系による植物体再生

メロンにおける不定胚経由の植物体再生は、Youngら (1983) により始めて報告された。その後、振とう培養などの培養方法を組み合わせて用いることによりいろいろな系統および外植片から不定胚を誘導し植物体を再生させたことが報告されている (Oridate and Oosawa 1986 ; Kageyama ら 1990, 1991)。Honmaら (1991) は、Oridate and Oosawa (1986) の方法を改良した方法に従って誘導した不定胚では形態により植物体再生率が異なるという興味ある結果を報告している。いずれの方法もオーキシンをサイトカイニンよりも高濃度に添加した培地を用いて不定胚を誘導し、生長調節物質無添加の培地で誘導した不定胚を発育させ植物体を再生する方法である。

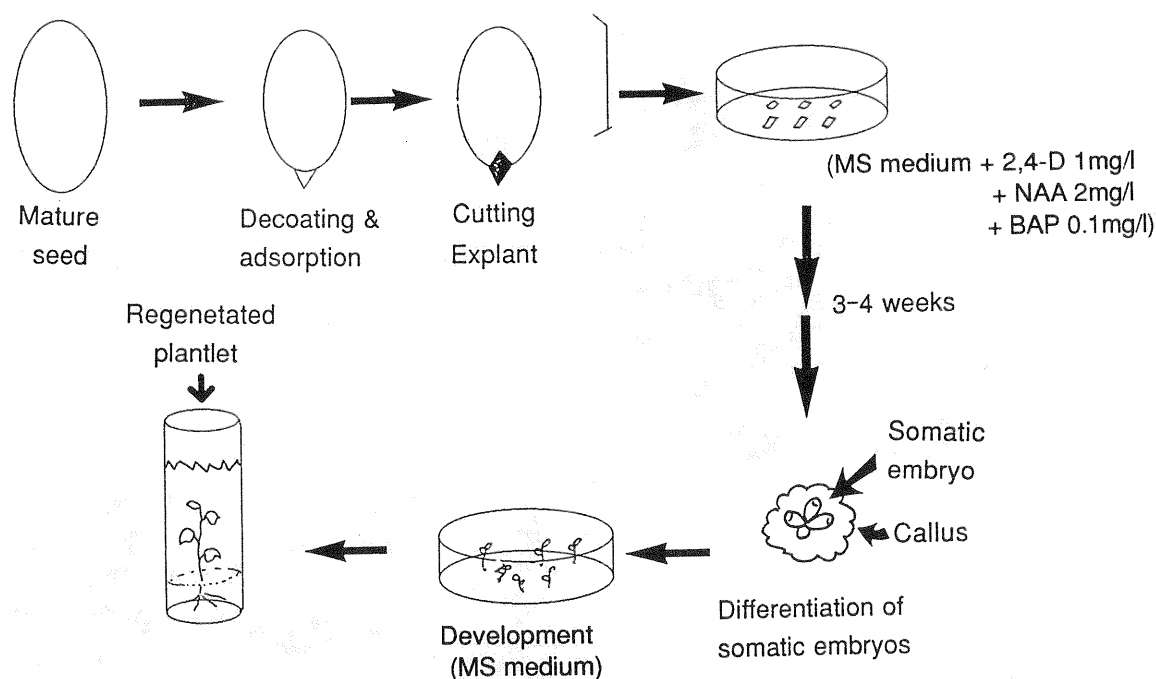


Fig.3. Schematic representation of plantlet regeneration through somatic embryogenesis.

不定胚の誘導過程においても、前節と同様、分化経路が変異を考える上で重要となる。本研究では不定胚形成培養系として Oridate and Oosawa (1986) の方法を改変した方法を用いた。本節では外植片からの不定胚誘導過程および誘導した不定胚からの植物体再生過程について観察した。

材料および方法

Oridate and Oosawa (1986) によって報告された方法の一部を改変した不定胚形成法を用いた (Fig. 3)。

‘プリンスメロン’、‘アンデス’ および ‘アムス’ の完熟乾燥種子から取り出した胚を以下の方法で表面殺菌した。即ち、70 % エタノールで 15 秒間、1 % アンチホルミン液で 15 分間殺菌し、滅菌水で 3 回 (5 分/回) 洗浄した。殺菌後、滅菌水中に浸漬して 6 時間吸水させた。吸水した胚から胚軸部を取り出し、不定胚形成培地 (MS 培地 + 2, 4 ジクロロフェノキシ酢酸 (2, 4-D) 1 mg/l + α -ナフタレン酢酸 (NAA) 2 mg/l + BAP 0.1mg/l + ショ糖 3 % + ゲルライト 0.4 %) に置床した。25 °C、16 時間日長 (白色蛍光灯、3,000 lx) 下で培養し、不定胚形成過程の経時的変化を観察した。培養 4 週間後に誘導された不定胚について調査した。不

定胚の継代培養については、外植片から不定胚を 1 個ずつ分離して MS 培地に移植し、4 週間培養後に発育した不定胚について調べた。

結果および考察

メロンの完熟種子の胚から切り出した胚軸外植片 (Fig. 4-A) を不定胚形成培地上で培養すると、培養開始 5 日後には培養した胚軸の中央部分が肥大し始めた (Fig. 4-B)。14 日後には外植片の表皮が弾け内部からカルスが現れ、外植片全体がカルスにおおわれた。更に、3 週間後にはカルス表層に不定胚が観察された (Fig. 4-C)。不定胚は球形胚から魚雷型胚までいろいろな形態が観察された。これらの不定胚は培養を継続すると魚雷型胚まで発育し生長を停止した。発育した不定胚は生長調節物質無添加の MS 培地に移植すると 3 日後には発根した。更に培養を続けると胚軸が伸長し本葉が展開するもの、胚軸は伸長せず本葉が展開するものなどいろいろな発育様式を示した (Fig. 4-D)。発根し本葉が展開した小植物体 (Fig. 4-E) は容易に馴化できた (Fig. 4-F)。一部の個体は半透明状となったり、奇形となったが、先端部分を切り取って、継代培養を繰り返すと正常な個体となった。

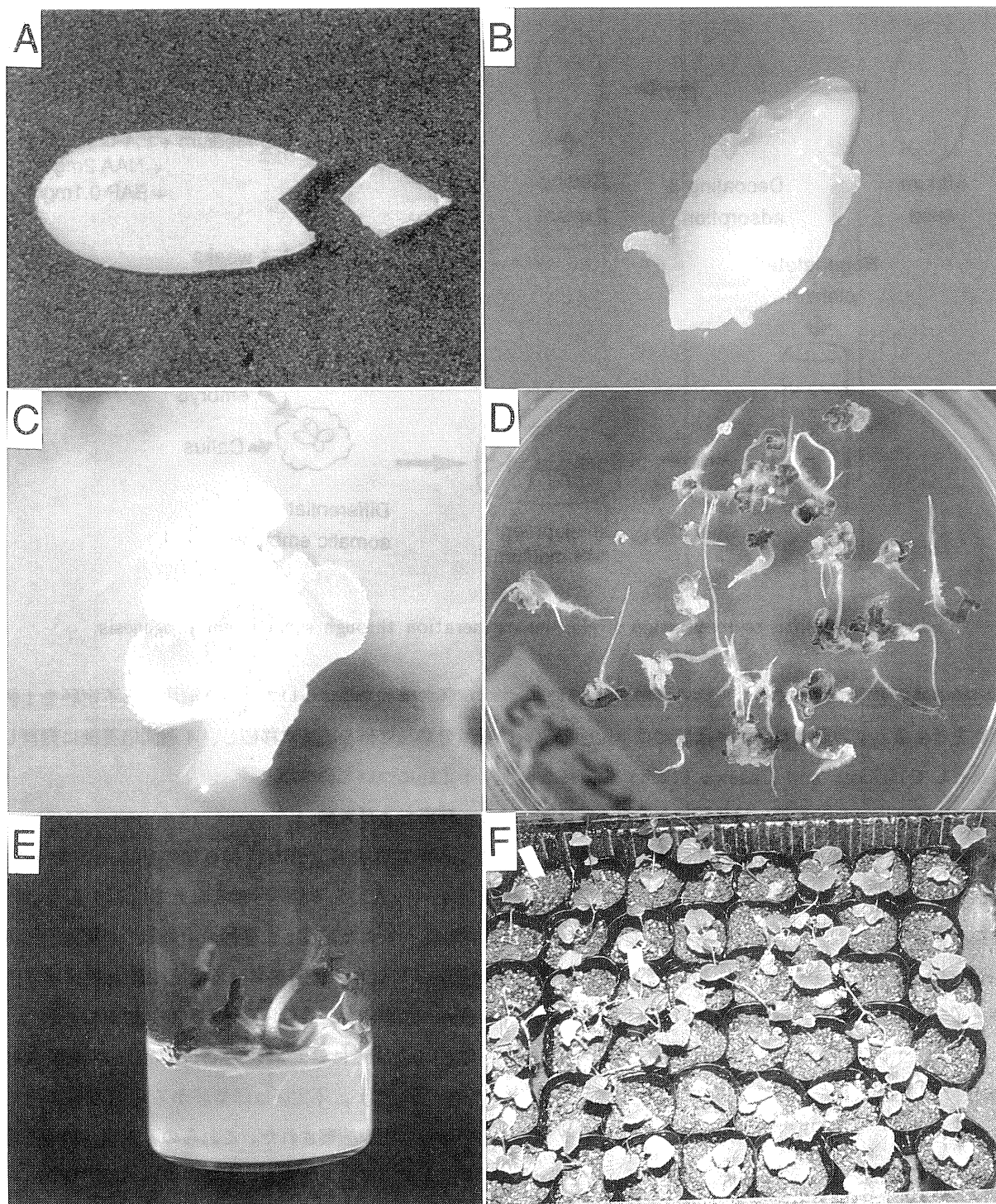


Fig.4. Plantlet regeneration through somatic embryogenesis.

A, hypocotyl explant ; B, thickening explant after 5 days of culture ; C, differentiating somatic embryos on the callus after 3 weeks of culture ; D, germinating somatic embryos ; E, plantlet developing from somatic embryo with expanding leaves ; F, acclimatized plants.

不定胚分化過程の顕微鏡観察から本節で用いた不定胚形成培養系はカルス経由の再分化系であると判断された。本節で使用した培地と同じ組成の培地を用いて茎、本葉および茎頂組織から不定胚誘導を行った Kageyama ら (1990) の実験でも誘導された不定胚はカルス経由の再分化であった。

本節で用いた 3 品種は、この培養条件でいずれの場合も不定胚の誘導が可能であった (Table 3)。不定胚を形成した外植片の割合は、用いた 3 品種については、‘プリンスメロン’ (79 %) および ‘アムス’ (74 %) では高く、‘アンデス’ (61 %) が他の 2 品種に比べて低くなり、品種間差が認められた。

Table 3. Induction of somatic embryos (SE) from excised hypocotyl explants of mature seeds

Cultivars	No. of explants cultured	No. of explants forming SE	%
Andes	27	16	61
Ams	31	23	74
Prince	33	26	79

誘導した不定胚の発育率は、51 ~ 87 % であった (Table 4)。発育しなかった不定胚は、緑化した後、変化がなくやがて枯死するもの、発根したのみでシュートが伸長しないもの、再びカルス化するものなどが認められた。

以上より Oridate and Oosawa (1986) の方法を改変した不定胚形成培養系は、本研究で用いた品種に適用可能であり、更に改良を加えることにより不定胚形成率も向上するものと判断された。

Table 4. Plantlet development from somatic embryos (SE) of cultured explants of mature seeds

Cultivars	No. of SE cultured	No. of SE germinated	%
Andes	33	17	51
Ams	64	43	67
Prince	30	26	87

3 苗条原基形成培養系による植物体再生

苗条原基形成培養系は、Tanaka and Ikeda (1983) により *Haplopappus gracillis* を用いて始めて報告された植物体再生法である。通常、回転培養法により植物体の茎頂部を培養すると、増殖が早くしかも植物体再生能力の高いドーム状の細胞集塊 (苗条原基) が得られる。*H. gracillis* の苗条原基は、染色体レベルの観察では遺伝的な安定性が高いと報告されている。茎頂培養や茎頂を外植片とする多芽体形成法と同様に植物の大量増殖法として有効であるとされ、多くの植物種で苗条原基の誘導が報告されている (谷口 1988)。

メロンでの苗条原基誘導は、永井ら (1989) により始めて報告され、誘導した苗条原基は高い植物体再生能力を維持したまま数年以上の長期継代培養が可能であることが明らかとなっている (下西ら 1993)。メロンの場合、苗条原基の長期継代に伴う遺伝的な安定性については研究されておらず、今後の課題である。

本実験では、‘プリンスメロン’ を用い、苗条原基を誘導して植物体を再生させ、苗条原基の誘導過程と誘導した苗条原基からの植物体再生過程について観察した。

材料および方法

永井ら (1989) によって報告された苗条原基誘導法を用いた (Fig. 5)。*‘プリンスメロン’* の完熟乾燥種子から取り出した胚を以下の方法で表面殺菌した。即ち、70 % エタノールで 15 秒間、1 % アンチホルミン液で 15 分間殺菌し、滅菌水で 3 回 (5 分/回) 洗浄した。続いて 1/2 MS 培地に無菌播種し、25 °C、16 時間日長 (白色蛍光灯、3,000 lx) 下で培養した。3 週間後に生育した植物体から茎頂部位を 0.5 mm の大きさで切り出し、苗条原基誘導培地 (MS 培地 + BAP 1 mg/l + NAA 0.01 mg/l + ショ糖 3 %) に置床し、2 rpm の速度で回転培養した。この培地で誘導された苗条原基は、3 ~ 4 週間ごとに分割し、継代培地 (MS 培地 + BAP 1 mg/l + ショ糖 3 %) で維持した。25 °C、16 時間日長下で培養し、苗条原基誘導過程の経時的変化を観察した。更に苗条原基を分割し、シュート形成培地 (MS 培地 + BAP 0.2 mg/l + ショ糖 3 % + ゲルライト 0.2 %)、続いてシュート伸長培地 (MS 培地 + ショ糖 3 % + ゲ

ルライト 0.2%) に継代しシュートを伸長させた。伸長したシュートは1本ずつ切り離し、発根培地 (1/2 MS 培地 + ショ糖 3% + ゲルライト 0.2%) に移植し発根させた。

結果および考察

無菌播種した 'プリンスメロン' の種子は3日後には発芽し、続いて子葉、本葉が展開した。この無菌小植物体の先端 (Fig. 6-A) から茎頂を切り出し、苗条原基誘導培地で回転培養すると、本葉が展開し、生長点部分がドーム状に肥大した (Fig. 6-B)。本葉部分を切り離し、残った部分の培養を更に続けたところ茎頂部分が苗条原基化した (Fig. 6-C)。切り口部分にはカルス形成が認められたが、誘導された苗条原基は茎頂が脱分化をせずに増殖した組織塊であると判断された。'プリンスメロン' を用いた下西ら (1993) の苗条原基発達過

程の組織学的な観察でも、脱分化を伴わない茎頂組織の増殖であることが確認されている。この苗条原基は、継代培地で維持増殖が可能であった。維持していた苗条原基を分割し、シュート形成培地に継代 (Fig. 6-D) すると、カルス化せずにシュートが形成した (Fig. 6-E)。この時点でシュート伸長培地に継代すると、シュートが伸長した (Fig. 6-F)。シュートは 1/2 MS 培地に継代すると、2週間程度で発根した。半透明状となる小植物体があったが、先端部分を切り取り、発根培地で継代培養を繰り返すと、正常な個体となり、容易に馴化できた。

以上のことから、本研究で用いたメロンの苗条原基形成培養系は、苗条原基誘導および植物体再生過程を通して脱分化を伴わない、茎頂からの直接的な植物体再生方法であると判断された。

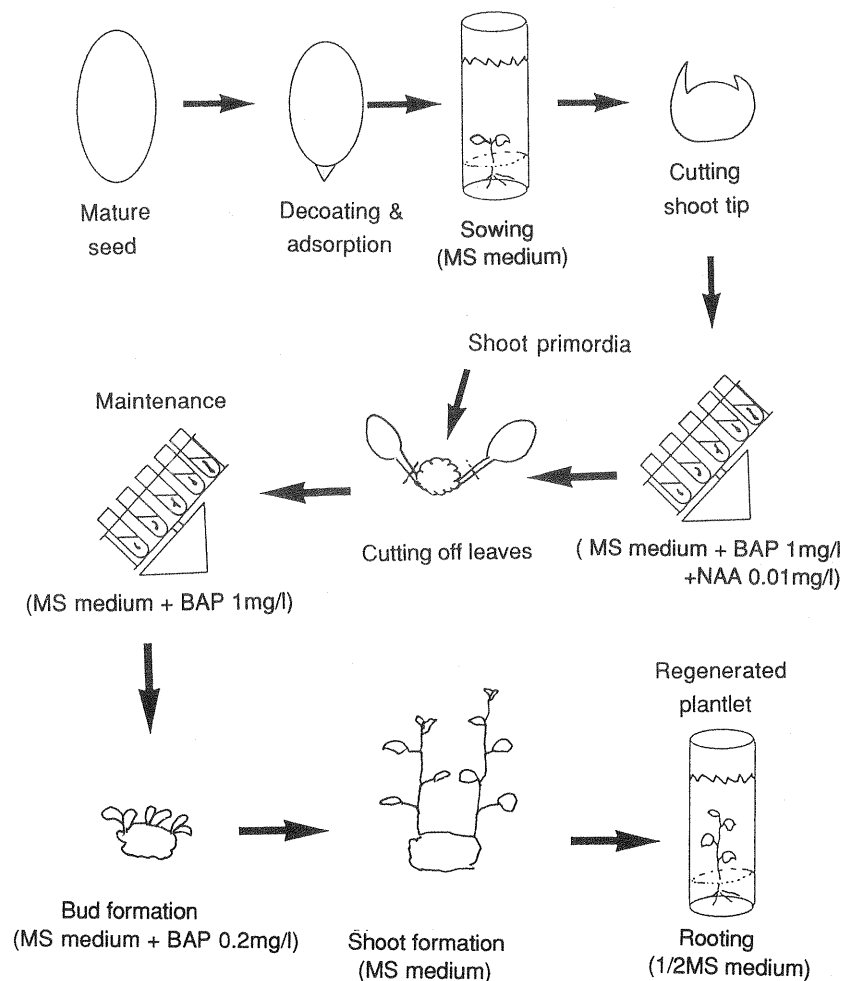


Fig.5. Schematic representation of plantlet regeneration through shoot primordia.

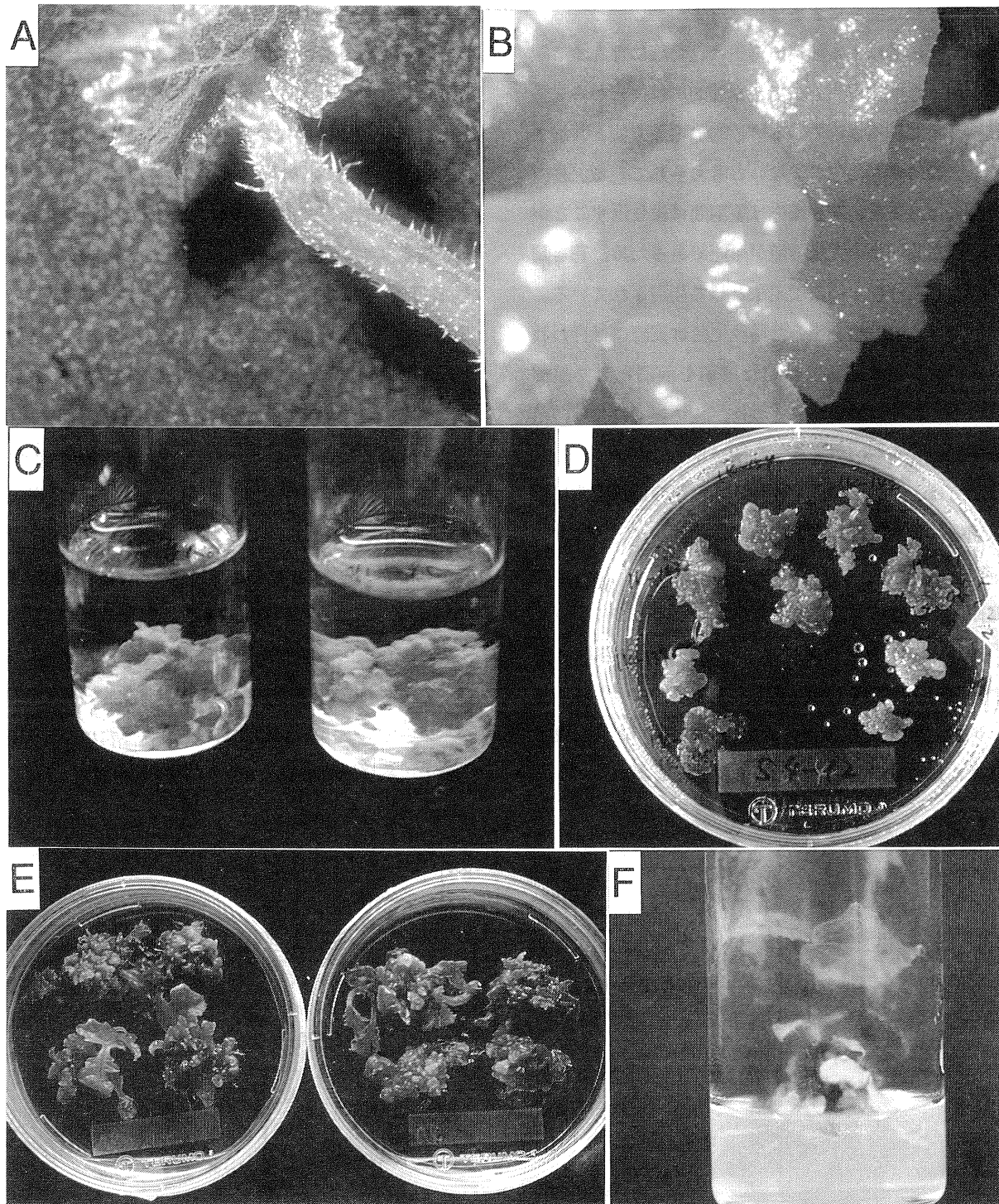


Fig.6. Plantlet regeneration from shoot primordia.

A, apical part of axenic plantlet ; B, thickening meristem tip between leaf primordia ; C, shoot primordia induced ; D, shoot primordia just after subcultured on the bud formation media ; E, forming buds from the shoot primordia ; F, shoot formed from the shoot bud.

4 腋芽伸長培養系による植物体再生

腋芽伸長培養による植物体再生は、葉腋に存在する腋芽を利用した個体再生方法で、原理的には従来から栄養繁殖性作物で利用されている耕種的な増殖方法と共通であり、一般に変異発生が少ないと考えられている。耕種的方法に比べると、培養操作は短期間に繰り返すことが可能で、対象作物の大量増殖が可能であるため、花き類を中心とした作物で種苗増殖法として利用されている。メロンではこの方法を用いた種苗生産は実際には行われていないが、この方法を用いた増殖を前提として品種‘福の香’が種苗登録されており、メロンではこの種苗増殖法に対する期待が大きい。

本節では、‘プリンスメロン’の腋芽伸長培養系における植物体再生過程について観察した。

材料および方法

腋芽伸長培養による植物体再生は以下の方法によった (Fig. 7) 。‘プリンスメロン’の完熟種子から取り出した胚を以下の方法で表面殺菌した。即ち、70 %エタノールで15秒間、1 %アンチホルミン液で15分間殺菌した後、滅菌水で3回 (5分/回) 洗浄した。1/2 M

S培地に無菌播種し、25℃、16時間日長 (白色蛍光灯、3,000 lx) 下で培養して育成した。4週間後に生育した植物体を1節ずつに切り分け、1/2 MS培地に継代培養し、腋芽の伸長過程の経時的変化を観察した。

結果および考察

無菌培養した‘プリンスメロン’の胚は3日後には発芽し、培養開始4週間後には約4節をもつ植物体へと発育した (Fig. 8-A) 。これを1節ずつに切り分け1/2 MS培地で継代培養したところ (Fig. 8-B) 、継代した時点の顕微鏡観察では葉腋部に腋芽が観察できなかった (Fig. 8-C) が、継代培養3日後には葉柄基部に腋芽の形成が確認された (Fig. 8-D) 。その後、腋芽は伸長し (Fig. 8-E) 、培養4週間後には約5節をもつ植物体にまで生長した (Fig. 8-F) 。この場合、1節をもつ外植片から1つの完全な小植物体が得られた。また継代培養約10～14日後には発根が認められた。以上の操作を繰り返すことで、実生の増殖が可能であった。‘アンデス’および‘アムス’では、腋芽の発達や根の分化するまでの期間が‘プリンスメロン’より数日長かったが、その他は同様の培養経過を示し、実生の増殖が可能であった。

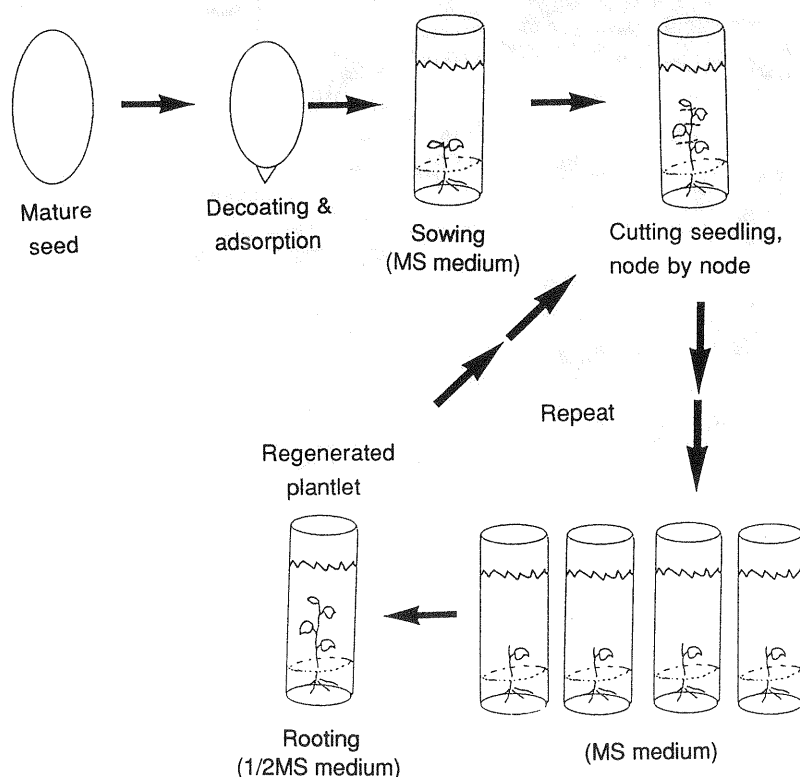


Fig.7. Schematic representation of plantlet regeneration through axillary branching

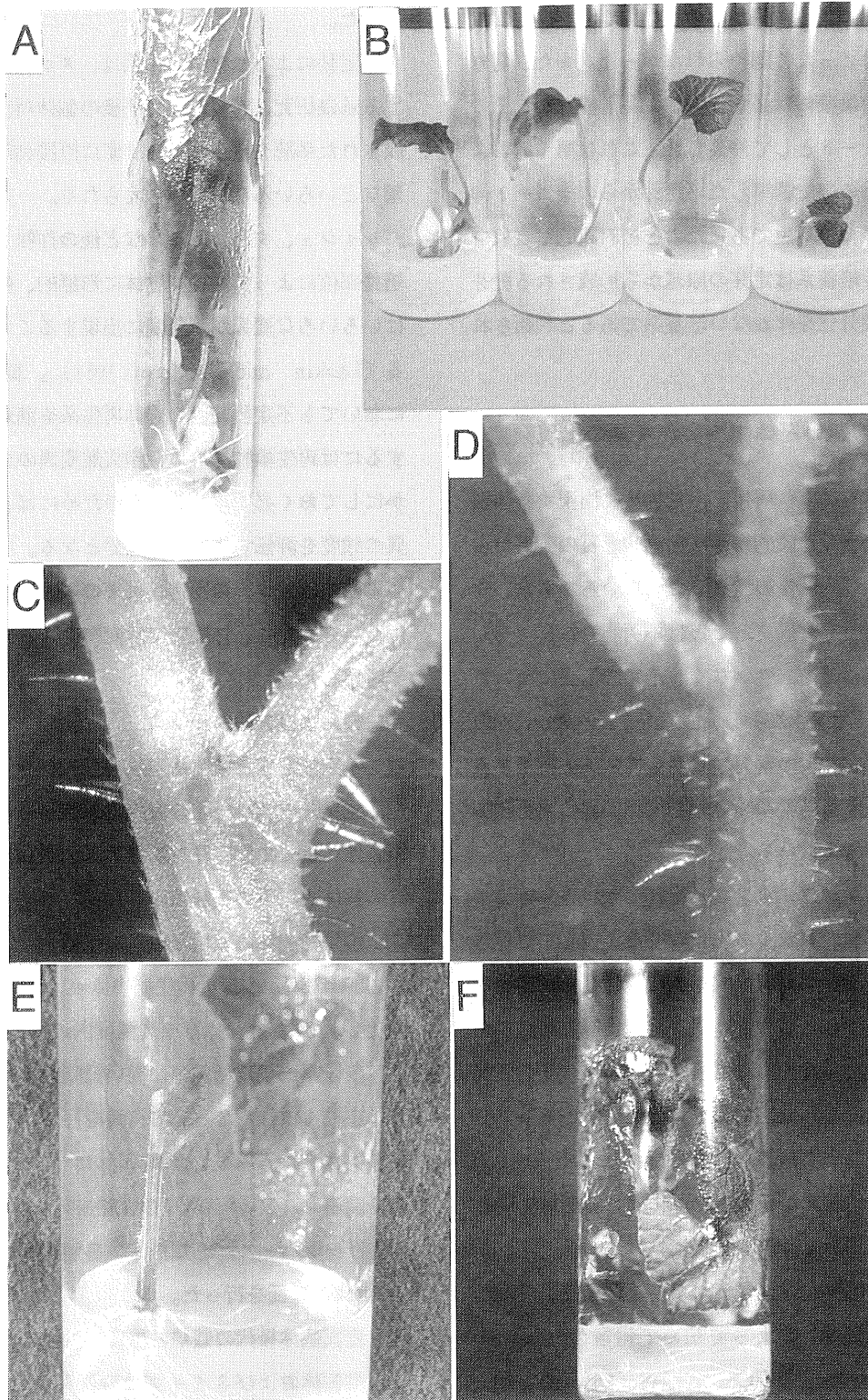


Fig.8. Plantlet regeneration through axillary branching.
A, axenic plant from seed ; B, node explants from the axenic plant ; C, leaf base of explant just after cutting ; D, developing definite bud from leaf base after 3 days of culture; E, elongating definite bud; F, regenerated plants from definite bud.

腋芽伸長培養による腋芽からの植物体の再生過程では、カルス化現象はまったく認められなかった。また、切り分けた外植体の葉腋には必ず腋芽が1個形成され、そのほとんどがシュートとして伸長した。これは第1節および第2節の実験の中で誘導した不定芽からのシュート伸長や不定胚の発育が不良であったのとは対象的な現象であり、腋芽伸長培養系は定芽の原基から形成される腋芽を発育させる脱分化を伴わない培養系であると判断された。

Ⅲ 培養系の違いと体細胞突然変異の出現頻度

細胞・組織培養により再生した植物体に出現する体細胞突然変異は検出が比較的容易な形態的形質の変異から検出が困難な生理的形質の変異までいろいろであり、全ての変異を把握し、評価することは不可能である。一方、体細胞突然変異には方向性がなく、全ての形質について発生していると考えられている(Larkin and Scowcroft 1981)。従って、特定の形質に着目して変異を調査することで、対象とする培養系の体細胞突然変異の出現頻度の評価が可能と考えられる。

本章では、第1節でメロンの不定胚形成培養系による再生植物体の形態変異とその出現頻度を調査し、培養系に起因する体細胞突然変異の相対的出現頻度を評価する指標について検討した。その結果、倍数性変異として四倍体が高頻度に出現していることが判明した。そこで第2節では倍数性変異を指標にメロンの異なる培養系での体細胞突然変異の出現頻度の評価を行った。

1 不定胚形成培養系の再生植物体に現れる形態変異と体細胞突然変異を評価する指標

メロンの不定胚形成は、子葉および茎頂組織からの形成がYoungら(1983)によって初めて報告された。その後も胚軸(Morenoら1985)、子葉(Oridate and Oosawa 1986; Trulson and Shahin 1986)、本葉(小川ら1990)、茎(小川ら1990; Kageyamaら1990)、茎頂(Kageyamaら1990)などのメロンのいろいろな器官・組織からの体細胞不定胚の誘導が報告されている。またこのように誘導された体細胞不定胚から再生した植物体は小植物体の段階で観察したところ形態的に正常で

あった。

不定胚による植物体再生系は、メロンでは胚発生に関する基礎研究、形質転換処理後の個体再分化、選抜・育成された系統を固定操作をせずに直接利用する場合の増殖などいろいろな利用が考えられる。一方、サトウキビ、バレイショ、タバコ、イネなど他の作物では培養方法や培養部位によって再生植物体に形態的、生態的、生理的にいろいろな変異が高頻度に出現することが知られている(Larkin and Scowcroft 1981)。従って、メロンにおいても不定胚経由の個体再生系を前述の目的で利用するには再生植物体の体細胞突然変異の発生程度を明らかにしておく必要がある。そのためには、体細胞突然変異の頻度を評価する指標が重要となる。

本節ではメロンの不定胚由来の再生植物体の形態変異について調査し、体細胞突然変異を評価する指標について考察した。

材料および方法

(1) 不定胚形成と植物体再生

品種グリーンパールの完熟乾燥種子から第Ⅱ章第2節の方法に従って不定胚を誘導し、小植物体を得た。これらの個体を以下の実験に用いた。

(2) 再生植物体の栽培と後代の採種

1989年5月29日に再生植物体40個体(R₀世代)を順化し、6月20日にガラス温室内の隔離ベッドに定植し、茨城県野菜耕種基準に従い抑制栽培の作型で栽培した。主枝1本仕立てとして自殖を行い、1株当たり1果を着果させた。着果した33個体について葉形および果形を調査し、R₁世代種子の採種を行った。対照として‘グリーンパール’を栽培し、自殖を行い同様の調査とS₁世代の採種を行った。

(3) 変異個体後代の栽培と生育・稔性の調査

正常個体および3タイプの変異個体(Table 5)から採種したR₁世代の種子を1990年2月15日に播種し、3月16日に定植して半促成栽培の作型で栽培した。主枝1本仕立てとし、1株当たり1果を着果させた。草丈、節数の調査は4月17日、果形、葉形の調査は5月24日に行った。自殖を行い、着果した個体(株)について葉形および果形を調査し、R₂世代種子の採種を行った。

同様に偏平果をつけた R_2 世代についても1990年7月26日に播種し、抑制栽培の作型で栽培した。自殖を行い着果した個体について果形を調査し R_3 世代種子の採種を行った。対照として‘グリーンパール’の S_1 、 S_2 を栽培した。採取種子については成熟種子数の調査を行った。

Table 5. Frequency of morphologically abnormal types in R_0 plants derived from somatic embryos*

Origin of plants	Leaf type	Fruit type	No. of plants	Frequency (%)	Morphological type
SE**	heart	round	13	39	I
SE	heart	flat	3	9	II
SE	star	round	10	30	III
SE	star	flat	7	22	IV
Seedling	heart	round	12	100	—

* R_0 plant : regenerated plants in primary culture.

** SE : somatic embryo.

(4) 染色体数観察

正常果実をつけた R_1 世代と偏平果実をつけた R_1 世代以降の種子を発芽させた。種子根の根端を酵素解離法(庄ら、1990)により観察した。即ち、種皮をむきろ紙上に播種して3日後の幼植物体の根端を、蒸留水中に入れ4℃で1昼夜低温処理し、酢酸エタノール(1:3)で固定した。固定した根端を4%セルラーゼオノズカRS、1%ペクトリアーゼY-23、7.5 mM KCl、7.5 mM EDTA、pH 4.0の酵素液により37℃で1時間処理した。処理後、酵素液を蒸留水で洗い流した。水分を取り除き、前述の固定液を滴下し材料をスライド上に拡散させた。自然乾燥後、リン酸緩衝液(pH 6.8)で25%に希釈した顕微鏡用のギムザ液(Merk, USA)中で室温下において1時間染色した。染色液を水洗し、自然乾燥させ、分裂中期細胞の染色体数を観察した。

結果

‘グリーンパール’の不定胚由来の再生植物体を栽培し、形態的変異について調査を行った。その培養当代(R_0)の個体には、対照区として栽培した‘グリーンパー

ル’の実生個体に比べて形態的差異のない正常個体(タイプI)、果実が偏平になる変異個体(タイプII)、葉の欠刻が深く星型となる変異個体(タイプIII)およびこれら2つの形態的変異を合わせもつ変異個体(タイプIV)の4タイプが確認された(Table 5)。それぞれの出現割合は、39、9、30および22%で、変異個体は用いた個体の61%を占めた。なお、対照として栽培した‘グリーンパール’には培養再生個体に認められた形態変異を示す個体は認められなかった。

Table 6. Genetic variation of morphological characters of R_1 plans of somatic embryos*

Morphological type** of regenerated plants in primary culture	Line	No. of R_1 plans examined	No. of R_1 plants obtained			
			Leaf type		fruit type	
			Heart	Star	Round	Flat
I	E-31	42	42	0	42	0
II	E-25	18	18	0	0	18
III	E-23	26	26	0	26	0
IV	E-37	2	1	1	0	2
IV	E-46	34	32	2	0	34
Seedling	—	32	32	0	32	0

* R_1 Plant : progeny of regenerated plant in primary culture.

** I : Leaf shape, heart ; fruit shape, round.

II : Leaf shape, heart ; fruit shape, flat.

III : Leaf shape, star ; fruit shape, round.

IV : Leaf shape, star ; fruit shape, flat.

正常個体および各タイプの変異個体から採種した次代(R_1)を栽培すると、 R_0 世代で葉形と果形により分類された4タイプのうち、両形質が正常な個体(タイプI)の R_1 世代は、全ての個体において両形質とも正常となった(Table 6)。果形のみが偏平な個体(タイプII)の R_1 世代は、全ての個体において果形が偏平となり、葉形は正常となった。葉のみが星型となる個体(タイプIII)の R_1 世代では、葉の欠刻が回復し、全て正常葉となった。葉形と果形の2つの形態変異形質を合わせもつ個体(タイプIV)の R_1 世代では、葉形については、用いた2系統のうちの1系統では、栽培した2個体のうち1個体が正常型に回復し、他の1系統では、34個体中の32個体が正常型に回復した。一方、果形については、

2系統とも全ての個体で偏平となった。なお、対照として栽培した‘グリーンパール’の S_1 個体には、葉形および果形が変異個体に類似している個体の分離は認められなかった。従って、培養当代(R_0)に高頻度で認められた2つの変異形質の中で果実の偏平形質のみが遺伝的変異と判断された。そのため不定胚由来再生植物体のうちタイプIIとIVが遺伝的変異をもつ個体と考えられ、その割合は合計31%であった。また、この果実偏平の形質は R_2 世代、 R_3 世代においても全個体に安定的に発現した(Table 7)。

Table 7. Transmission of flat character of fruits to R_2 and R_3 generations in somaclonal variants

Line	Generation	No. of plants examined	No. of plants	
			Fruit shape	
			Round	Flat
E-25	R_2	9	0	9
E-37	R_2	2	0	2
E-46	R_2	10	0	10
E-46	R_3	5	0	5

変異の遺伝性が確認された偏平果実系統E-46の R_1 、 R_2 及び R_3 世代の染色体観察を行った結果、いずれの個体においても $2n=48$ 本の染色体が観察された(Fig. 9-A)。 $2n=24$ の染色体数は2n=24であり、偏平果実系統は四倍体(4x)と判断された。正常果実をつけた系統E-31とE-23から採種した R_1 世代の染色体数はいずれの個体においても $2n=24$ (Fig. 9-B)を示し、同系統は二倍体(2x)と判断された。

四倍体は、果実が偏平となる形質(Fig.10-B)以外にも二倍体と比較して多くの相違点が認められた。生育については、四倍体は二倍体に比べて初期伸長生長が遅く、節間が短い傾向にあった(Table 8)。また、側枝の発生が少なく、発生した側枝も極端に短い傾向があった。花器については、四倍体は二倍体に比べて大型の雄花(Fig.10-C)を多数着け(Fig.10-E)、また、柱頭が露出した両性花(Fig.10-G)を着けた。果実については花落ち部分が大きく(Fig.10-D)、栽培中に裂果しやすいとともにネットが太く張りが悪い傾向にあった。種子については、四倍体は二倍体に比べ

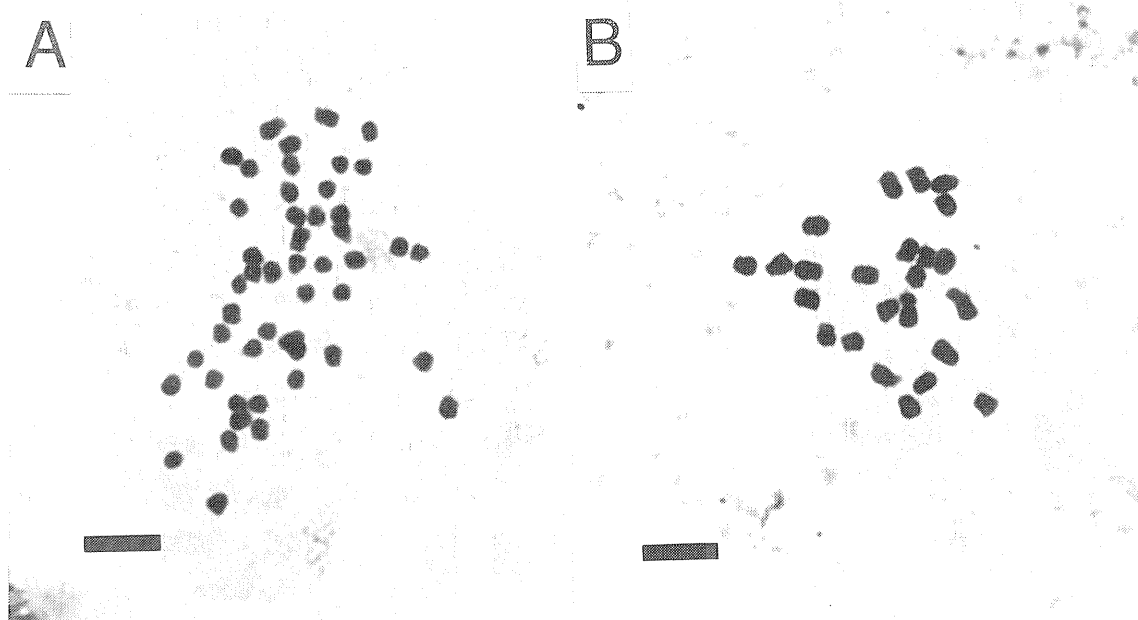


Fig.9. Chromosome number of melon derived from somatic embryos.
A : $4x=48$ (flat fruit), B : $2x=24$ (round fruit). Bars : $5 \mu m$.

て丸みを帯びた形態で、明確に判別ができた (Fig.10 - F) 。 ‘グリーンパール’ の二倍体果実は通常8割前後の稔実種子を含んでいた (Table 9) 。しかし、四倍

体ではその割合が低く、用いた R_2 および R_3 世代の 12 個体中で最も稔実種子率の高かった系統 E - 46 - R_2 - 3 においても 35.9% であった (Table 9) 。

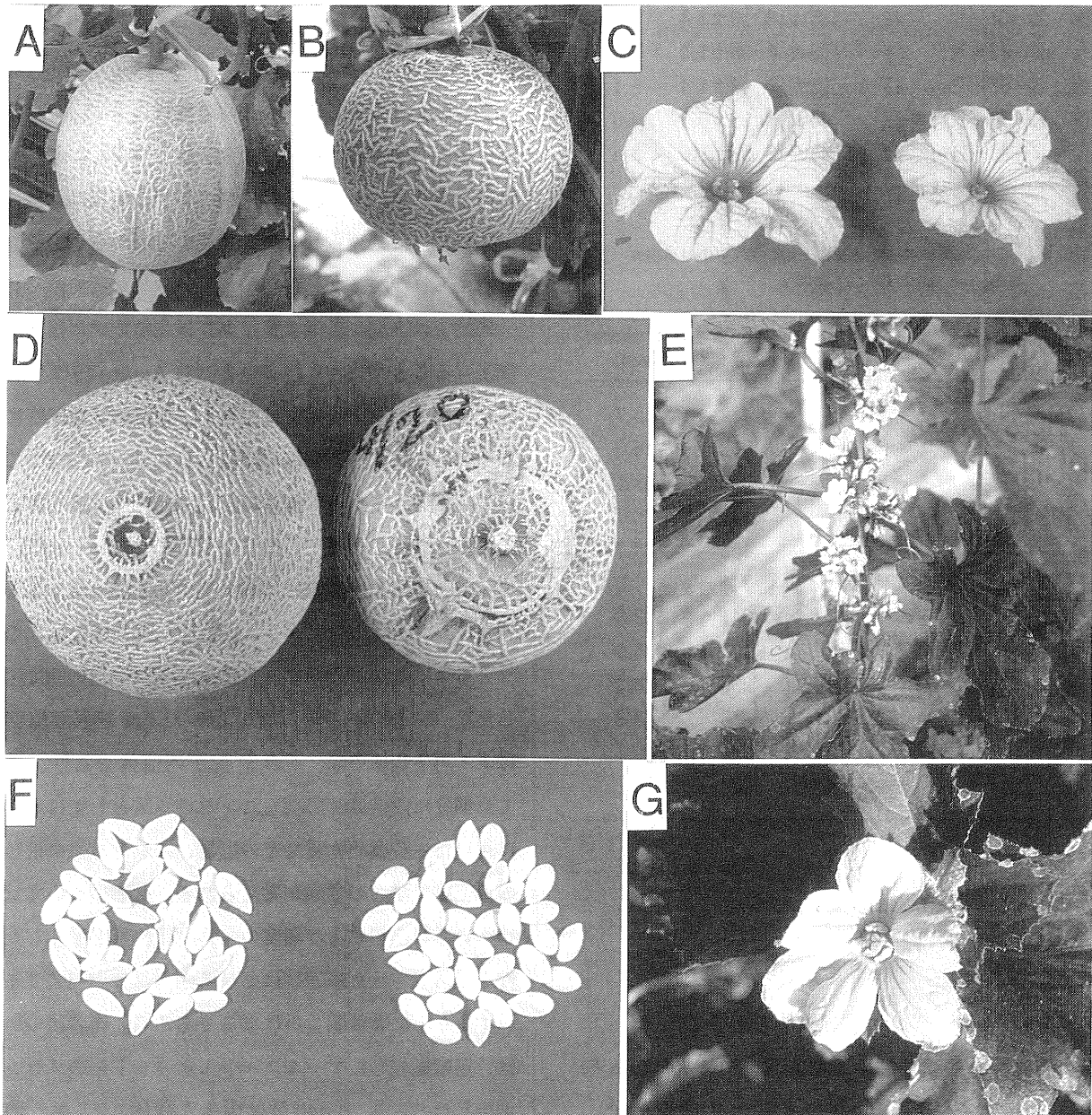


Fig.10. Morphological characteristics of tetraploid melon derived from somatic embryos. A, normal fruit (diploid) ; B, flat fruit (tetraploid) ; C, male flower of tetraploid (left) and diploid (right) ; D, blossom end of tetraploid (right) and diploid (left) ; E, tetraploid bearing many male flowers ; F, seeds of tetraploid (right) and diploid (left) ; G, hermaphrodite flower of tetraploid.

Table 8. Comparison of initial growth between diploid and tetraploid of melon plants derived from somatic embryos.

Ploidy	Strain	No. of plants	Height of plants (cm) (A)	No. of nodes (B)	Internode length (cm) (A/B)
2x	E-31-R ₁	42	135±13	23±1.4	5.9
2x	E-23-R ₁	26	133±8	25±1.3	5.3
4x	E-25-R ₁	18	93±12	18±1.4	5.1
4x	E-37-R ₁	2	60±3	15±0.0	4.0
4x	E-46-R ₁	34	83±16	23±1.6	3.6

Table 9. Comparison of seed maturity between diploid and tetraploid

Strain	Ploidy	Generation	Plant No.	No. of seeds set	% of matured seeds
E-25	4x	R ₂	1	282	0.7
			2	312	16.0
			3	290	35.1
E-37	4x	R ₂	1	172	22.7
			2	152	23.7
E-46	4x	R ₂	1	241	7.0
			2	241	22.8
			3	103	35.9
E-46	4x	R ₃	1	236	20.3
			2	315	23.8
			3	226	30.1
			4	289	35.1
Green pearl	2x	F ₂	1	352	83.2

考察

メロンの不定胚由来の再生植物体の培養当代 (R₀) に認められた顕著な2種の形態変異の中で、葉の欠刻のみが大きくなる変異は、後代 (R₁) で発現せず、遺伝変異ではなかった。この変異は、不定胚誘導時に用いた生長調節物質などの培地条件や培養再生植物を育成する段階での栽培的な要因による一時的な変異であると考えられる。一方、果形のみが扁平となる変異は、後代 (R₁、R₂、R₃) においても安定して全個体に発現し、遺伝的な変異であった。メロンの培養再生植物の当代に扁平果実が出現することは、末松ら

(1986) のメロン不定胚由来植物体においても報告されており、彼らはこの個体が四倍体である可能性を示唆している。そこで本研究では扁平果実をつけた個体の種子 (R₁) を用いて根端細胞の染色体観察を行ったところ、2n=48の染色体が観察された。メロンの染色体数は2n=24であるので、扁平果実をつけた個体は四倍体 (4x) であると推測された。

両形態変異を合わせもつ個体の後代 (R₁) においても、果形の扁平となる変異は全個体で発現し、遺伝変異と考えられた。一方、葉の欠刻に関する変異は、後代の一部の個体で認められたが、前述の結果から遺伝変異とは考えられなかった。

植物では細胞・組織培養により再生植物体に倍数体が出現することが報告されている (D'Amato 1977) が、多くの場合その出現頻度は小さい。植物の培養細胞にはいろいろな倍数性の細胞が出現し、再分化の過程でこれらの細胞のうちから二倍体の細胞が選択的に植物体として再生されることが知られており (Krikorian 1983)、従って、再生植物に倍数体が出現する頻度は低くなる。例えばニンジンでは、カルス細胞が広範な染色体数の変異をもつにもかかわらず、二倍体植物体が選択的に再生した (Mok 1976)。本研究で用いた不定胚形成培養系による再生個体では、その31%が四倍体であり、極めて高頻度に四倍体が発現した。この原因としては培養中に用いた生長調節物質などの影響、メロン本来の倍数性の不安定性などの要因が考えられる。前者については、いろいろな種類および濃度の生長調節物質を添加した条件下で再生させた植物体における四倍体の出現頻度を検討することにより明らかになるであろう。後者については、自家採種したアールス・フェボリット系のメロンを調査したところ、1,440個体中に5個体 (0.3%) の自然倍加の四倍体が発見された報告 (鈴木 1958) があり、メロンが本来四倍体の変異を引き起こしやすい作物であるとも考えられる。メロンの不定胚形成培養系を前述したいろいろな場面で利用するには、四倍体の出現機構とその制御についての研究が必要である。

倍数体は生長点組織をコルヒチン処理することにより作出されるのが一般的であり、メロンにおいてもコルヒ

チン処理により四倍体が作出されている (Batra 1952) が、栽培中の自然倍加によっても出現している (鈴木 1958)。これらの四倍体と本研究で不定胚形成培養系により作出した四倍体とは、果実が偏平、花落ち部が大きい、節間が短い、側枝が短いなどの特徴について極めて類似していた。本研究の結果では、不定胚形成培養系により再生した個体の 31% が四倍体になっており、この不定胚形成培養系がメロンにおいて新たな四倍体作出法になると考えられる。

メロンの細胞・組織培養による植物体再生法としては、本研究で対象とした不定胚形成培養系 (Oridate and Oosawa 1986) の他に不定芽形成培養系 (Dirks and Buggenum 1989)、プロトプラスト培養系 (山中ら 1990)、苗条原基形成培養系 (永井ら 1989) などいろいろな方法が報告されている。しかし、いずれの方法についても再生した植物体の変異についての研究は行われていない。本研究の結果から、メロンは *in vitro* 培養によって極めて四倍体が出現しやすい作物であることが予想されたが、一方では、それらの培養系は、遺伝子導入や大量増殖などへの利用が試みられている。従って、不定胚形成培養系により再生した植物体で認められた高頻度の四倍体出現という現象が、不定胚形成培養系に特異的な現象なのか、あるいはその他の培養系にも普遍的現象なのか、それらの場面で利用するにあたって検討しておく必要があると考えられる。第 2 節ではメロンの培養系の違いによる四倍体出現頻度についての検討を行い、培養系の違いと染色体突然変異の出現頻度について考察する。

2 染色体数変異を指標とした異なる培養系における体細胞突然変異出現の差異

メロンの細胞・組織培養による植物体再生方法としては不定芽形成培養系 (例 Dirks and Buggenum 1989)、不定胚形成培養系 (例 Oridate and Oosawa 1986)、苗条原基形成培養系 (永井ら 1989)、腋芽伸長培養系 (Ohki ら 1991) およびプロトプラスト培養系 (山中ら 1990; 豊田ら 1991; 野村ら 1993) の 5 つが報告されている。各培養系をメロンの遺伝的改良に利用するにあたり、その再生植物体の示す変異の種類について検討して

おく必要がある。

メロンの不定胚形成培養系に出現する倍数性変異の頻度とその遺伝的安定性については本章第 1 節で述べた。不定芽由来の再生植物体に倍数性変異が生じることは、Bouabdallah and Branchard (1986) によって報告されている。しかし、倍数体の種類、出現頻度、遺伝的な安定性などについては記載されていない。その他の培養系についても再生植物体の変異については報告されていない。

本節では、メロンの不定芽形成、不定胚形成、苗条原基形成および腋芽伸長培養系における再生植物体の倍数性変異 (四倍体) の出現頻度について調査し、異なる 4 種の培養系における体細胞突然変異の出現の有無を検討した。なお、プロトプラスト培養系は、調製したプロトプラストからカルスを誘導し、不定芽経由 (山中ら 1990; 豊田ら 1991) または不定胚経由 (野村ら 1993) で植物体を再生させる方法であり、植物体再生方法としては不定芽形成培養系または不定胚形成培養系の 1 つと考えられたので本研究では検討は行わなかった。

材料および方法

(1) 植物体再生

品種プリンスメロン、アンデス、アムスの完熟乾燥種子の一部を外植片とし、不定芽形成、不定胚形成、苗条原基形成および腋芽伸長培養系により植物体を再生させた。各培養系は、第 II 章の第 1 節と第 2 節の方法に従った。

(2) 再生植物体の栽培と四倍体の評価

各培養方法で再生した小植物は、バーミキュライトと赤玉土を 1 : 1 に混合した用土に鉢上げし、20℃、16 時間日長 (白色蛍光灯、12,000 lx) に設定したグロースキャビネット内で馴化した。馴化後、温室内に定植し、茨城県野菜耕種基準に従い半促成または抑制栽培の作型で栽培した。各品種の実生個体を対照区として栽培した。仕立て方は主枝 1 本仕立て 1 果着けとした。開花後、自植を行い採種した。採種した種子を播種し、種子根の染色体数観察して倍数性の判別を行った。

(3) 染色体観察

25℃の暗黒下で培養植物の後代種子を発芽させ、播

種4日後に根端を採取して蒸留水に入れ、5℃で1日間低温処理した。処理後、エタノール：酢酸＝3：1の固定液で固定した。プレパラートの作成および染色は前節の方法に従った。但し、酵素液の処理時間は1時間、ギムザ液による染色時間は30分とした。

結果および考察

不定胚形成、不定芽形成、苗条原基形成および腋芽伸長培養系由来の再生植物体および各品種の実生個体を温室内で栽培した。不定胚、不定芽および苗条原基由来の再生植物体は、偏平果実または対照区と同じ球形果実をつけた。不定胚由来植物体の1%、不定芽由来植物体の2%、苗条原基由来植物体の1%が結実しなかった。腋芽伸長培養系によりクローン増殖した植物体と各品種の実生は全て球形果実のみを着けた。種子根の染色体数観察の結果、偏平果実を着けた植物体は四倍体（ $4x=48$ ）であり、正常果実を着けた植物体は二倍体（ $2x=24$ ）であった。この観察結果は、前節で見出した再生植物体の果実形態と倍数性との関係と一致していた。

遺伝的に安定した四倍体がメロンの不定胚形成培養系による再生植物体に高頻度に出現することを前節で報告した。本実験では、すべての方法による再生植物体に四倍体が確認された（Table 10）ことから、メロンの再生植物体での四倍体出現という現象は、不定胚形成培養系に特異的な現象ではなく、メロンの組織培養に普遍的な現象であると考えられる。

Bouabdallah and Branchard (1986) は、メロンの再生植物体に二倍体、三倍体、四倍体を確認し、倍数性のレベルは、不均一であるとしているが、それらの頻度や特徴については記載していない。本研究では、結実した植物体は二倍体と四倍体のみであり、1%程度の個体は結実しなかった。二倍体と四倍体の交雑により三倍体を作出した後述の実験（第V章の第1節）では、三倍体は生長調節物質処理なしでは結実しなかったもので、結実しなかったわずかな個体が Bouabdallah and Branchard が記載している二倍体と四倍体以外の倍数性植物体の可能性があると考えられる。

四倍体は用いた全品種で不定胚および不定芽由来の再生植物体に見いだされた（Table 10）。苗条原基由来の再生植物体には、‘プリンスメロン’ と ‘アムス’ で四倍体が確認された。用いた全品種の合計で四倍体の割合は、不定胚または不定芽由来の植物体で高く、それぞれ31%、30%であった。苗条原基由来の植物体では、四倍体植物出現の頻度は前述の二つの方法に比べて低く、4%であった。腋芽伸長培養による増殖植物体には四倍体は確認できなかった。

本実験の不定胚形成、不定芽形成および苗条原基形成培養系における四倍体出現頻度は鈴木（1958）によって記載された自然突然変異によるメロン四倍体出現頻度（0.3%）の10から100倍に相当し、極めて高頻度に出現することから、これらの培養系はメロンの四倍体植物

Table 10. Frequency of tetraploids in melon plants regenerated by various tissue culture methods.

<i>In vitro</i> culture method	Rate of tetraploid/regenerated plant*			
	Cultivars			Total
	Prince	Andes	Amus	
Seedling	0/38(0.0)	0/46(0.0)	0/45(0.0)	0/129(0.0)
Somatic embryo	12/33(36.4)	14/65(21.5)	26/72(36.1)	52/170(30.6)
Adventitious bud	11/51(21.6)	21/61(34.3)	22/71(31.0)	54/183(29.5)
Shoot primordia	5/100(5.0)	0/12(0.0)	1/33(3.0)	6/145(4.1)
Axillary bud	0/72(0.0)	0/117(0.0)	—	0/189(0.0)

*Numbers in parenthesis represent percentages.

の作出に有効であると考えられる。一方、腋芽伸長培養系による増殖植物体には四倍体は見いだされなかった。前者の三つの方法では、外植体の性質により、または、培養過程において外植片ないしは培養体に人為的操作を加えていること、ならびに培地に生長調節物質を添加していることなど、形態形成上の不安定要因の存在が推測される。これに対し、腋芽伸長培養系では外植片の構造上安定性が高く、生長調節物質無添加であるなど不安定要因が少ないものと考えられる。

本節で取り上げたメロンの各種培養系の中で不定芽形成および不定胚形成培養系では、このように再生植物体に四倍体が高頻度（約30%）に出現するので、これらの培養系は倍数性による品種改良に有効に利用できるものと考えらる。更に、これらの培養系をメロンにおける遺伝的操作に応用しようとした場合、発生するほかの変異についても検討しておく必要がある。第Ⅵ章の第3節では、これらの培養系を利用した低温伸長性メロンの選抜を実施し、不定芽形成および不定胚形成培養系の変異拡大方法としての有効性について検証した。

Ⅳ 倍数性変異の出現機構の解析

メロンの各種培養系と再生植物体における倍数性変異の出現頻度について検討した結果、不定芽形成、不定胚形成および苗条原基形成培養系において四倍体植物の出現することが判明した。特に不定芽形成および不定胚形成培養系でその頻度が高く、再生植物体の約30%が四倍体であった。また、苗条原基形成培養系での四倍体出現頻度は4%であったが、鈴木（1958）によって報告されている自然突然変異体としての四倍体の出現頻度0.3%に比べて高い値であった。

本章では、第1節および第2節で二倍体を外植片とした場合の不定芽及び不定胚培養系の培養初期から植物体再生過程における培養細胞の染色体数の変化について調べ、第3節で四倍体を外植片とした場合の不定芽形成および不定胚形成培養系の再生植物体の染色体数の変化を観察し、メロンの組織培養に伴う染色体変異出現機構について検討した。

1 不定芽形成培養系の植物体再生過程における細胞の倍数性変異

メロンでは胚軸、子葉（Moreno ら 1985 ; Bouabdallah and Branchard 1986 ; Dirks and Buggenum 1989）および本葉（Dirks and Buggenum 1989 ; Kathal ら 1988）を外植片とした不定芽形成培養系が報告されている。Bouabdallah and Branchard（1986）は不定芽形成培養系による再生植物体に倍数性変異が生じていることを確認しているが、その種類や出現頻度の詳細については記載しておらず、また、培養系の進行に伴う培養細胞の変化についての報告は全くない。

本節では、メロンの不定芽形成培養系で外植片上に誘導されたカルス細胞および再生植物体の染色体数の変化を観察し、この培養系により再生した植物体に四倍体が高頻度に出現する機構について検討した。

材料および方法

(1) 不定芽形成培養系

本実験での不定芽形成培養系は、第Ⅱ章第1節の方法に従った。外植片として品種プリンスメロンとアンデスを用いた。

(2) カルス細胞の染色体数調査

不定芽誘導培地上で5、7、14日間培養した各品種のカルス培養体を、蒸留水中に入れ、5℃で1日間低温処理した後、固定液（エタノール：酢酸＝3：1）で1時間以上固定した。ついで培養体のカルス切断面の層を1mm角に切り出し、蒸留水で洗浄した。洗浄後、このカルス片をスライドガラス上にのせて酵素液を滴下し、37℃、暗黒下で50分間処理した。酵素液の組成は、セルラーゼオノズカRS 4%、ペクトリアーゼY23 1%、KCl 7.5mM、EDTA 7.5mM（pH 4.0）であった。処理終了後、酵素液を蒸留水で洗浄し、前述の固定液を滴下してからカルス細胞塊をスライドガラス上で単離させた。風乾後、リン酸緩衝液（pH 6.8）で希釈した20%ギムザ液（Merk, USA）を用いて室温下で30分間染色した。風乾後、分裂中期の細胞について染色体数を調査した。

(3) 再生植物体の染色体数の調査

不定芽経由で再生した無菌小植物体の根端を蒸留水中

に入れ5℃で1日間低温処理した後、前述の固定液で1時間以上固定した。以降はカルス細胞の染色体数の観察方法に従ってプレパラートを作成した。但し、酵素の処理時間は、1時間とした。小植物体あたり10個の分裂中期の細胞を観察し、倍数性を判断した。

結果および考察

‘プリンスメロン’ と ‘アンデス’ の不定芽形成培養系でのカルス細胞と再生植物体の根端細胞の染色体数の観察を行った。カルス段階では、いろいろな倍数性細胞と異数性細胞が観察された (Fig.11、Fig.12)。倍数性細胞の出現頻度を集計するにあたっては、培養中の細胞の倍数性変化を明確に把握するため、異数性細胞の頻度を最も近い倍数性細胞の頻度に加算した。

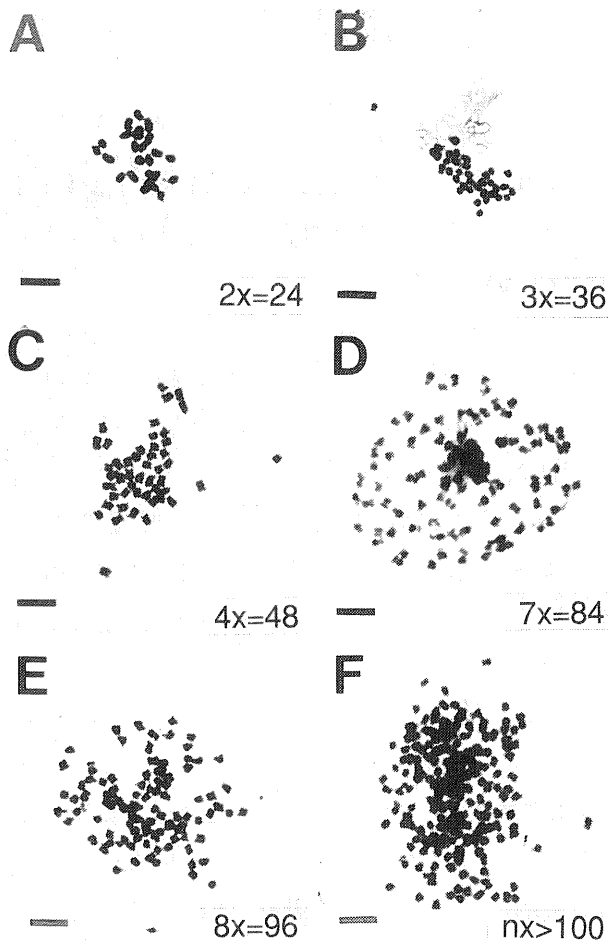


Fig.11. Chromosome of polyploid cells.
A: diploid, B: triploid, C: tetraploid, D: heptaploid, E: octoploid, F: hyperploid.
Bars: 5 μm . Cultivar: smooth skin melon 'Prince'. Culture method: adventitious bud-forming culture system.

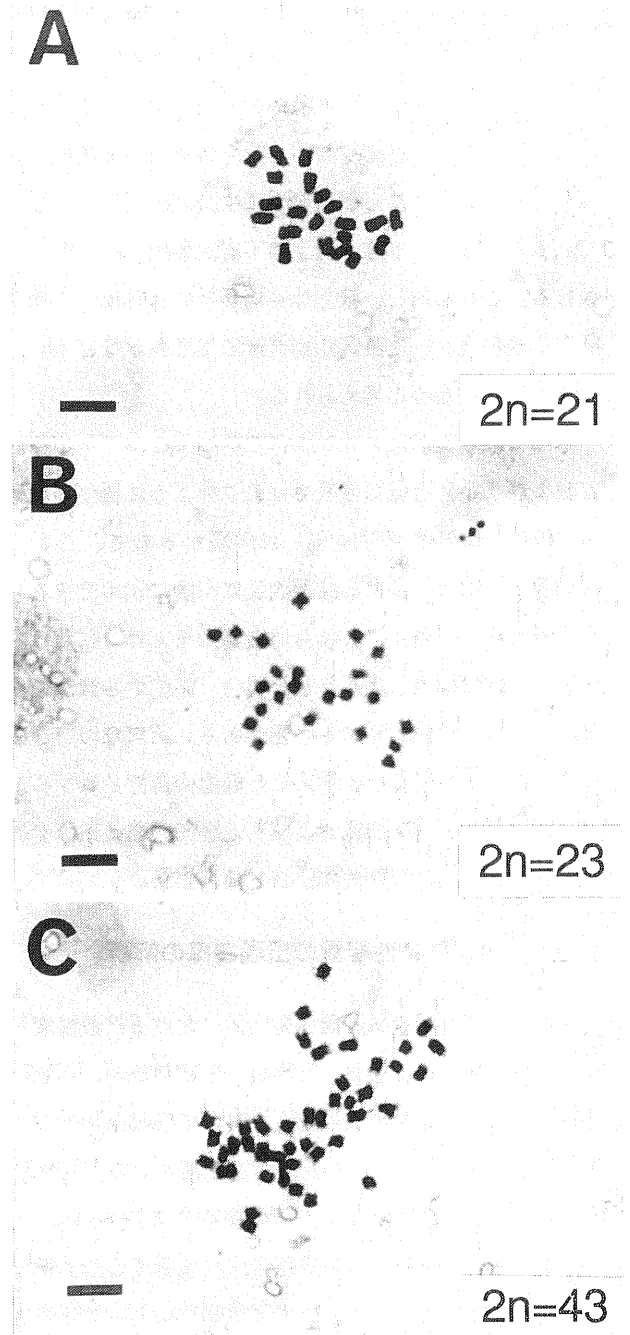


Fig.12. Chromosome of aneuploid cells.
Bars: 5 μm . Cultivar: smooth skin melon 'Prince'. Culture method: adventitious bud-forming culture system.

‘プリンスメロン’ では、培養5日後に二倍性 ($2x=24$)、四倍性 ($4x=48$) および異数性 ($2n=22-25$) 細胞が観察された。異数性細胞の出現頻度は2.5%であった。分裂細胞中では二倍性が98.0%、四倍性が2.0%であった (Fig.13-A)。培養7日後には二倍性細胞の頻度が76.5%に減少し、四倍性細胞の頻度は11.0

％に増加した (Fig.13 - B)。一方、半数性 ($x = 12$)、三倍性 ($3x = 36$) および六倍性 ($6x = 72$) 細胞が新たに出現した。異数性細胞の頻度は 24.5％に増加した。さらに培養 14 日後には二倍性細胞の頻度が 44.0％に減少し、四倍性細胞の頻度は 35.5％にまで増加した (Fig. 13 - C)。一方、七倍性 ($7x = 84$)、八倍性 ($8x = 96$) および九倍性以上の高次倍数性 ($nx > 100$) 細胞が新たに出現した。異数性細胞の頻度は 14.0％であった。

‘アンデス’ では、培養 5 日後に二倍性 ($2x = 24$)、四倍性 ($4x = 48$) および異数性 ($2n = 21 - 23$) 細胞が観察された。異数性細胞の頻度は 3.0％であった。分裂細胞中では二倍性が 96.5％、四倍性が 3.5％であった (Fig.14 - A)。培養 7 日後には二倍性細胞の頻度が 80.0％に減少し、四倍性細胞の頻度は 15.5％に増加した (Fig.14 - B)。一方、半数性 ($x = 12$)、三倍性 ($3x = 36$) および八倍性 ($8x = 96$) 細胞が新たに出現した。異数性細胞の頻度は 16.5％に増加した。さらに培養 14 日後には二倍性細胞の頻度が 30.0％に減少し、四倍性細胞の頻度は 27.5％にまで増加した (Fig.14 - C)。一方、五倍性 ($5x = 60$)、六倍性 ($6x = 72$) および九倍性以上の高次倍数性 ($nx > 100$) 細胞が新たに出現した。異数性細胞の頻度は 9.5％であった。

本実験の観察結果は、メロンの不定芽形成培養系では培養開始 1 週間後から 2 週間後という早い時期に培養細胞の染色体数に変化が起きていることを示している。植物の細胞・組織培養における細胞の倍数性の変異は、*Daucus carota* (Mok ら 1976)、*Kallstroemia pubescens* (Sengupta ら 1987)、*Citrus sinensis* (Gmitter ら 1991) など多くの植物種で報告されている。Ronichi ら (1992 a、1992 b) はニンジンの培養細胞で、不等核分裂や生殖細胞にみられるような減数分裂を観察しており、これらの現象と培養細胞の倍数化とが組み合わされて培養細胞では染色体数の変異が発生すると考察している。*K. pubescens* では培養 6 週間後においても培養細胞の 100％が初期の倍数性と同じ二倍性であった。*C.sinensis* では培養 12 週間においても観察した細胞の 89.9％～94.3％が初期の倍数性と同じ二倍体であった。

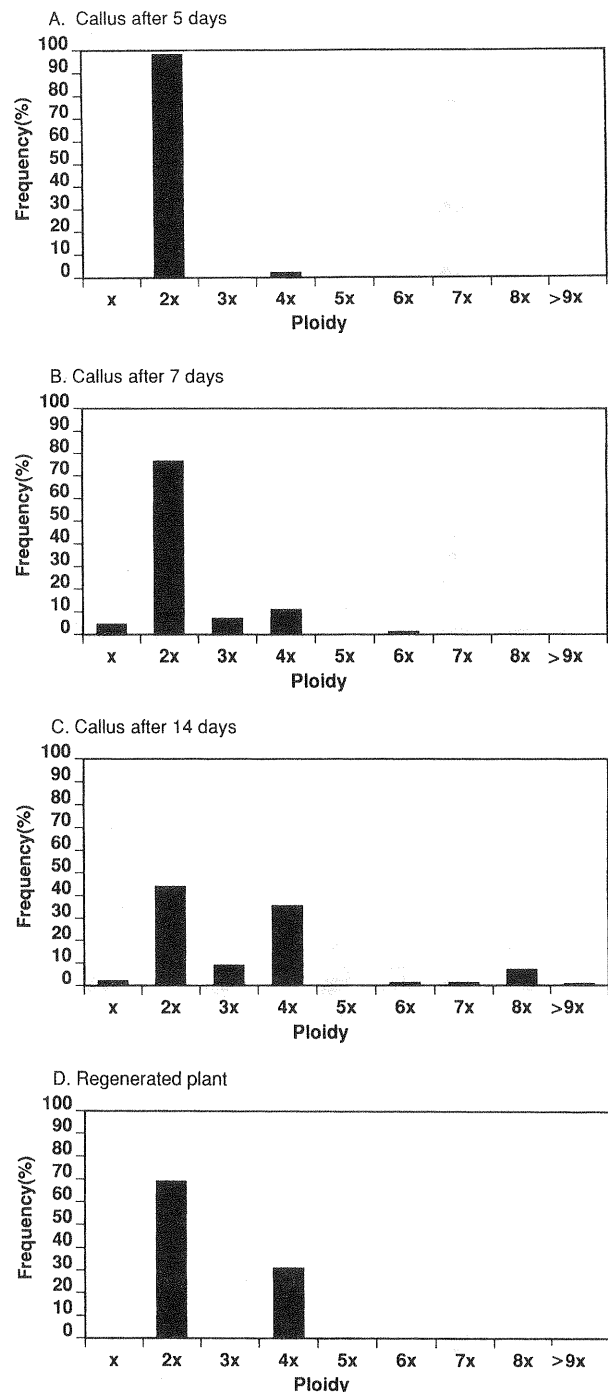


Fig.13. Variation of ploidy in callus cells and regenerated plants.
Cultivar : smooth skin melon 'Prince'.
Culture method : adventitious bud-system.

しかし、メロンの不定芽形成培養系では培養開始 2 週間後には観察したカルス細胞の 56.0％～70.0％が初期の倍数性と異なっていた。従ってメロンの不定芽形成培養系では、培養細胞の倍数性の変化が、それらの植物種に比べて急速に進行しているものと考えられる。

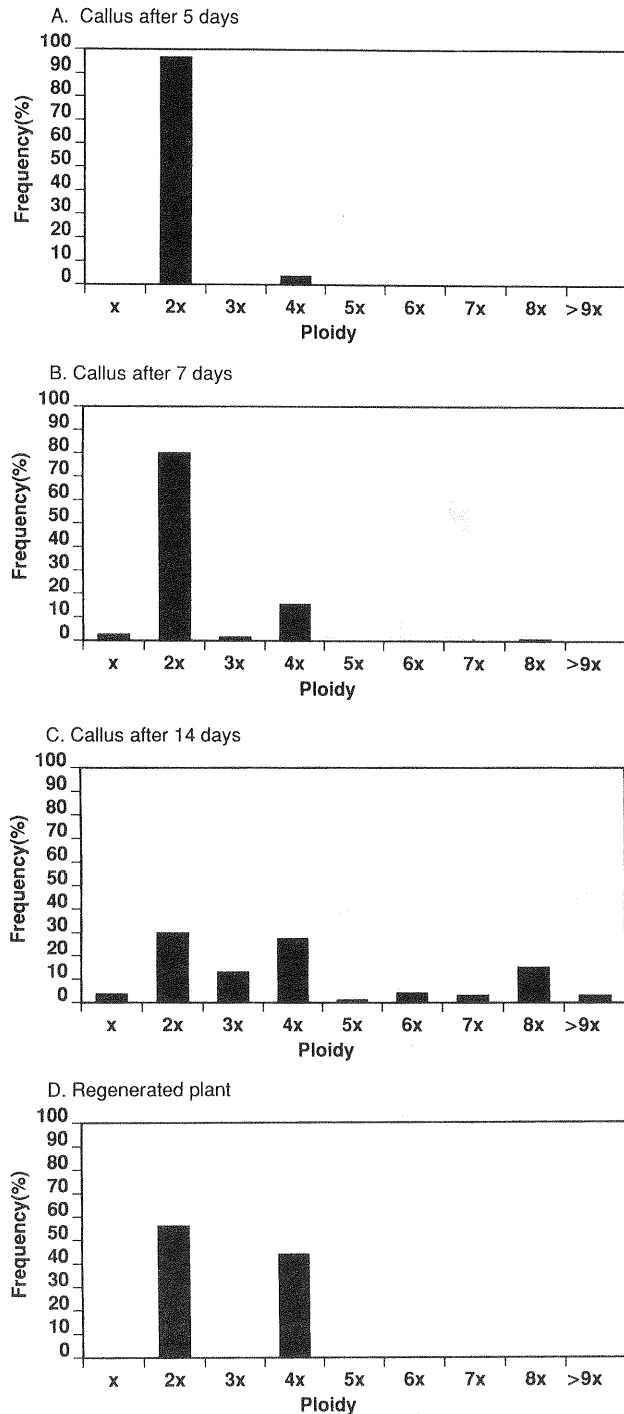


Fig.14. Variation of ploidy in callus and regenerated plants.

Cultivar : net skin melon 'Andes'.

Culture method : adventitious bud-system.

‘プリンスメロン’の不定芽由来の再生植物体では、69.0 %が二倍体、26.0 %が4倍体、5.0 %が二倍性と四倍性細胞からなる混数体であった (Fig.13 - D)。第Ⅲ章第2節の結果では、‘プリンスメロン’の不定芽由来の再生植物体の21.6 %が四倍体であった。本実験の

結果はこの値と一致していた。また再生植物体には四倍体以外の倍数体や異数体は観察されなかった。

‘アンデス’の不定芽由来の再生植物体では、56.0 %が二倍体、37.0 %が四倍体、7.0 %が二倍性と四倍性細胞からなる混数体であった (Fig.14 - D)。第Ⅲ章第2節の結果では、‘アンデス’の不定芽由来の再生植物体の34.4 %が四倍体であった。本実験の結果はこの値と一致していた。また‘プリンスメロン’と同様に再生植物体には四倍体以外の倍数体や異数体は観察されなかった。

メロンの不定芽形成培養系では、カルス細胞が半数性、二倍性、三倍性、四倍性、五倍性、六倍性、七倍性、八倍性、それ以上の高次倍数性の細胞で構成されているにもかかわらず、再生植物体は二倍体、四倍体および二倍性と四倍性細胞の混数体のみであった。この現象は、ノーネット型メロンである‘プリンスメロン’とネット型メロンである‘アンデス’に共通しており、メロンの不定芽形成培養系に一般的に当てはまる現象と考えられる。*Kallstroemia pubescens* (Sengupta ら 1987) や *Citrus sinensis* (Gimmitter ら 1991) ではカルス細胞にいろいろな倍数性細胞が観察されたにもかかわらず、再生植物体は全て二倍体であった。従って、これらの植物種では植物体の再生過程で二倍性以外の細胞が排除され、二倍性細胞のみから選択的に再生したと考えられる。*C. sinensis*では培養系を利用して四倍体を得ようとするれば、培地にコルヒチンを添加する必要があった。しかし、メロンの不定芽形成培養系の植物体再生過程では、コルヒチン処理などをしなくとも、二倍性細胞体以外に四倍性細胞も排除されずに独立に再分化するため、二倍性体および四倍性細胞から選択的に植物体再生が行われていると考えられる。

メロンの不定芽由来の再生植物体中には異数体は観察されなかった。組織培養による植物体の再生は異数体を得る方法の一つであり、トールフェスク (Eizenga 1989) やコムギ (Karp and Maddock 1984) ではカルス由来の再生植物体のそれぞれ 36 %、29 %が異数体であった。一方、*Lotus corniculatus* (Damiani ら 1985) ではカルス由来の再生植物体 72 個体中には異数

体は全く含まれていなかった。本研究の結果はメロンの不定芽形成培養系は、*L. corniculatus* と同様に異数性は作出されないことを示している。

2 不定胚形成培養系の植物体再生過程における細胞の倍数性変異

メロンでは、子葉 (Oridate and Oosawa 1986)、胚軸 (Moreno ら 1985)、本葉 (Kageyama ら 1990)、茎頂 (Young ら 1983) などいろいろな組織を外植片とした不定胚形成培養系が報告されている。しかし、これらの培養系における培養過程の進行に伴う培養細胞の染色体変異に関する研究は全く行われていない。

メロンの不定芽形成培養系では、培養過程の進行に伴い急速に細胞の倍数性変異が拡大した。しかし、不定芽形成、植物体再生の段階で二倍性および四倍性以外の倍数性細胞や異数性細胞が排除され、二倍性細胞または四倍性細胞から個体として再生することが明らかとなった (本章第 1 節)。

本節ではメロンの不定胚形成培養系で誘導されたカルス細胞、不定胚および再生植物体の染色体数の変化を観察し、この培養系の再生植物体に四倍体が高頻度に出現する機構について調べた。

材料および方法

(1) 不定胚形成培養系

本実験での不定胚形成培養系は、第 II 章第 2 節の方法に従った。外植片として品種プリンスメロンおよびサンデー秋 (横浜植木(株)) を用いた。

(2) カルス細胞の染色体数調査

培養 4 週間後に、培養体上に誘導された不定胚を取り除きカルスのみを前述の不定芽形成培養系のカルス細胞の観察方法に従って低温処理、固定を行いプレパラートを作成し、染色体数を観察した。

(3) 不定胚の染色体数調査

根端部の細胞分裂を促すために分化した不定胚を MS 培地上に置床し、2 日間 25℃、16 時間日長下で培養した。培養後、不定胚を蒸留水中に入れて 5℃で 1 日間低温処理した。処理後、前述の固定液で 1 時間以上固定した。以降は前述のカルス細胞の染色体数の観察方法に従ってプレパラートを作成した。但し、酵素の処理時間は、

50 分間とした。不定胚あたり 10 個の分裂中期の細胞を観察し、倍数性を判定した。

(4) 再生植物体の染色体数調査

不定芽由来再生植物体の染色体数の観察方法に準じた。

結果および考察

‘プリンスメロン’ の不定胚形成培養系のカルス細胞 129 個の倍数性を観察した結果、半数性から九倍性以上の高次倍数性まで種々の倍数性細胞が観察された (Fig. 15 - A)。各細胞の出現頻度は二倍性、四倍性および八倍性の順序で、それぞれ 41.9 %、27.9 %、11.6 %であった。その他の倍数性細胞は、いずれも 5 %以下の頻度であった。また、異数性細胞も散見されたが、計数においては細胞の倍数性の挙動を明確に把握するために最寄りの倍数性の細胞に含めて集計した。カルス細胞から誘導された不定胚 96 個について倍数性を観察した結果、二倍性、四倍性または八倍性のいずれかであった (Fig. 15 - B)。これら二倍性、四倍性および八倍性の不定胚の出現頻度は、それぞれ 50.6 %、38.5 %、11.5 %であった。更に、これらの不定胚から再生した植物体は二倍体および四倍体のみで、八倍体の植物体は再生しなかった (Fig. 15 - C)。再生植物体 60 個体について倍数性を観察した結果、二倍体と四倍体の出現頻度は、それぞれ 74.1 %および 25.9 %であった。不定胚および再生植物体には混数体や異数体は確認できなかった。

‘サンデー秋’ の不定胚形成培養系のカルス細胞 97 個の倍数性を観察した結果、‘プリンスメロン’ 同様に半数性から九倍性以上の高次倍数性までいろいろな倍数性の細胞が観察された (Fig. 16 - A)。各細胞の出現頻度は二倍性、四倍性および八倍性の順序で、それぞれ 43.3 %、25.8 %、15.5 %であった。その他の倍数性細胞は、いずれも 5 %以下の頻度であった。また、異数性細胞が散見されたが、プリンスメロンの場合と同様に細胞の倍数性の挙動を明確に把握するために最寄りの倍数性の細胞に含めて集計した。不定胚形成培養系に ‘サンデー秋’ を用いた場合も二倍性、四倍性および八倍性不定胚のみが誘導された (Fig. 16 - B)。不定胚 106 個について倍数性を観察した結果、二倍性、四倍性および八倍性不定胚の出現頻度は、それぞれ 32.1 %、57.5 %、

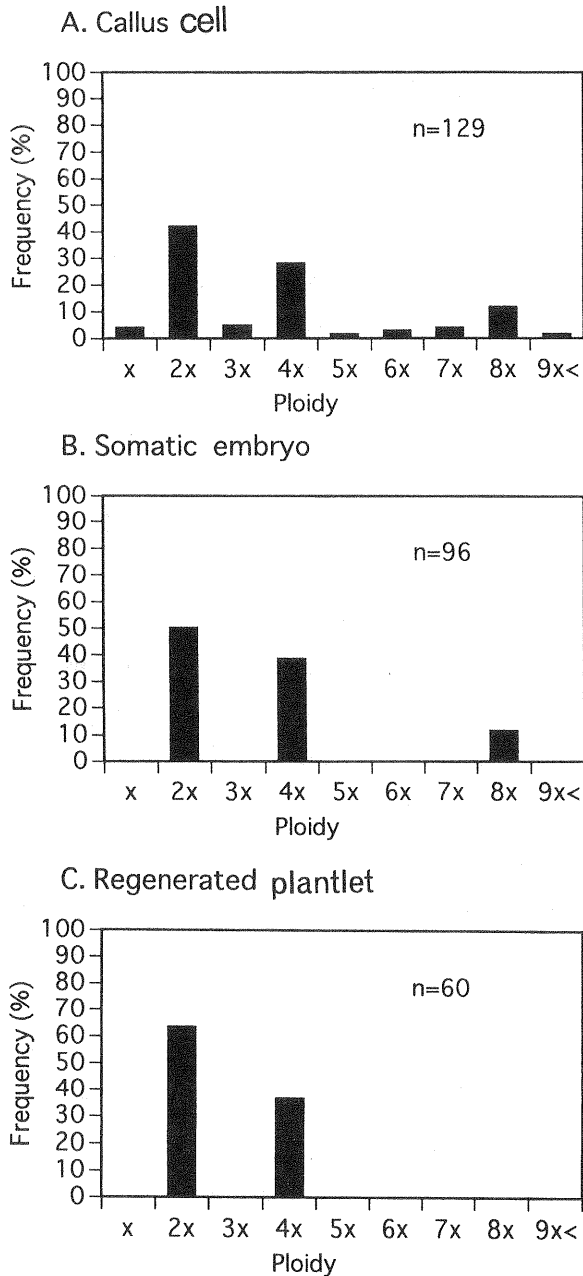


Fig.15. Variation of ploidy in callus cells (A), somatic embryos (B) and regenerated plants (C).
Cultivar: smooth skin melon 'Prince'.
Culture method: somatic embryo-system.

10.4%であった。八倍性不定胚からは植物体が再生せず、二倍性と四倍性の不定胚のみが植物体にまで再生した (Fig.16 - C)。再生個体 49 個体について倍数性を観察した結果、二倍体および四倍体の出現頻度は、それぞれ 55.1%および 44.9%であった。'プリンスメロン'と同様に不定胚および再生植物体には混数体や異数体は確認できなかった。

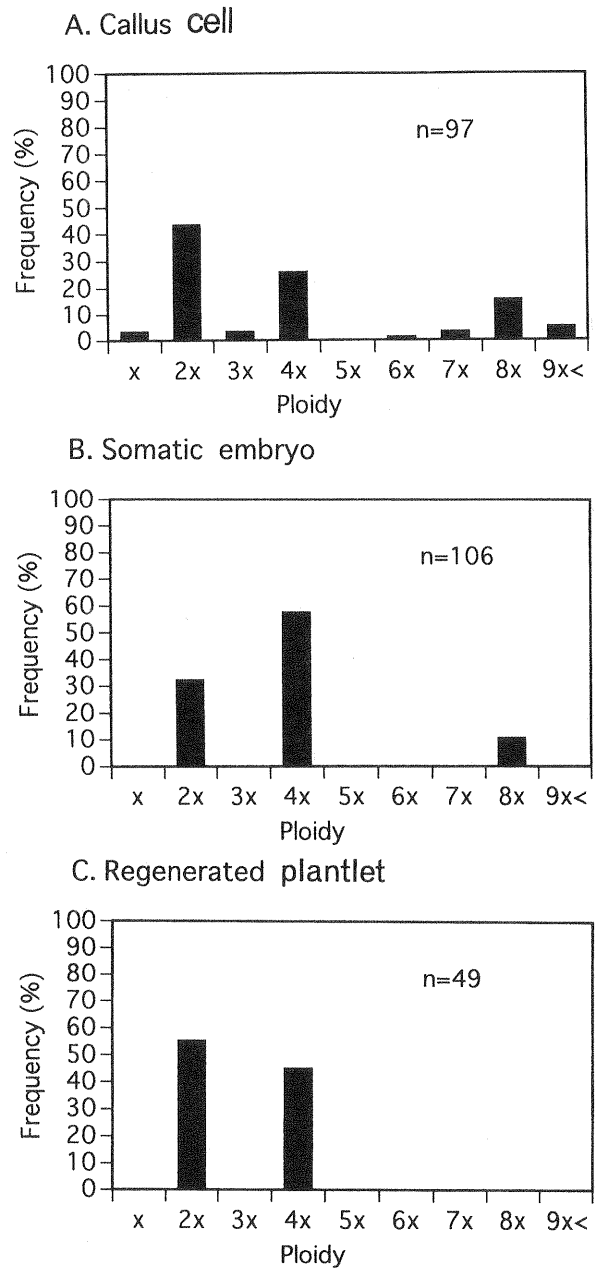


Fig.16. Variation of ploidy in callus cells (A), somatic embryos (B) and regenerated plants (C).
Cultivar: net skin melon 'Sunday-Aki'.
Culture method: somatic embryo-system.

不定芽由来の再生植物体には二倍性細胞と四倍性細胞とをもつ混数体が数パーセント観察されたが、用いた 2 品種のいずれにおいても、不定胚や不定胚由来の再生植物体には混数体が確認されなかった。このことは、メロンの不定胚形成培養系では、培養細胞が不定胚としての分化を始める以前の極めて初期において細胞の倍数化を終了し、不定胚としての分化が始まった後には細胞の倍

数化は起こっていないことを示唆している。メロンでは培養細胞の倍数化が急速に起こっていることが不定芽形成培養系でも示されている。*Brassica napus*や*B. oleracea*の小孢子からの不定胚発生過程の観察では、培養細胞の数パーセントで、培養の初期には完全な細胞質分裂がみられず、核分裂のみが行われていることが報告されている（新田・高畑 1993）。メロンの不定胚形成培養系における細胞の倍数化の時期を明らかにすることは、培養細胞の倍数性を制御すること、ならびに再生植物体の倍数化を抑制する上で極めて重要であるので、この点に関する詳細な研究が今後必要であると考えられる。

以上のことから、メロンの不定胚形成培養系では、培養過程の進行に伴い細胞の倍数化が急速に進行し、そのような多様な倍数性細胞の中で、二倍性、四倍性および八倍性細胞から選択的に不定胚が形成されると考えられるが、再生植物体が全て二倍体と四倍体であったことから、二倍性および四倍性不定胚から選択的に植物体が再生してくると考えられた。このような現象は、*Citrus sinensis*のembryogenic callusをコルヒチンで処理して誘導した不定胚においても観察されている（Gmitter ら 1991）。この場合、誘導した不定胚は二倍性、三倍性、四倍性、六倍性および八倍性であったが、再生植物体は二倍体と四倍体のみであった。しかし、コルヒチン処理を併用しないと再生植物体は全て二倍体であった。

本実験の結果と*C. sinensis*（Gmitter ら 1991）の結果から、細胞の倍数性と不定胚分化および不定胚からの植物体再生には一連の法則性があることが推測される。そこで、カルス細胞、不定胚および小植物体の段階で二倍性、四倍性および八倍性の比率を算出し、培養過程の進行に伴う倍数性の変化を比較した（Table 11）。

まず、倍数性について不定胚とカルス細胞との間で比

較すると、‘プリンスメロン’の不定胚では、二倍性／四倍性の比率が1.30でカルス細胞の1.50に比べて減少した。このことから四倍性細胞は二倍性細胞より不定胚に分化しやすいと考えられる。また、二倍性／八倍性の比率は3.61（カルス細胞）および4.35（不定胚）となり、四倍性／八倍性の比率も2.40（カルス細胞）から3.35（不定胚）へと増加した。‘サンデー秋’でも二倍性／四倍性の比率が1.68（カルス細胞）から0.55（不定胚）となり、四倍性細胞は二倍性細胞より不定胚に分化しやすいと考えられる。また、二倍性／八倍性の比率は2.80（カルス細胞）および3.09（不定胚）となり、四倍性／八倍性の比率も1.67（カルス細胞）および5.52（不定胚）となっていていずれも不定胚の方が高かった。このことから、八倍性細胞は二倍性細胞や四倍性細胞より不定胚に分化しにくいと考えられた。

つぎに、再生植物体と不定胚の倍数性について比較すると、‘プリンスメロン’の小植物体では、二倍体／四倍体の比率が1.72で不定胚の場合（1.30）に比べて増加していた。‘サンデー秋’の小植物体でも、二倍体／四倍体の比率が1.23となり不定胚（0.55）に比べて増加していた。これらの結果から、二倍性不定胚は四倍性不定胚より植物体として再生しやすいと考えられた。以上の結果から、カルス細胞からの不定胚分化の段階では、八倍性細胞＜二倍性細胞＜四倍性細胞の順に分化しやすいものと推測された。また、不定胚からの植物体再生の段階では、八倍性＜四倍性＜二倍性の順に再生しやすいものと考えられる。

倍数性の低い不定胚ほど植物体に再生しやすいことから、不定胚からの植物体再生効率を高めるには、倍数性の低い不定胚を誘導するような培養系の改良が有効と考えられる。メロンの不定胚は、‘アールスフェボリット

Table 11. Ratio between various polyploids of a callus, an embryo and a plantlet in somatic embryo-forming culture system

Culture stage	Diploid/tetraploid		Diploid/octoploid		Tetraploid/octoploid	
	Cultivars		Cultivars		Cultivars	
	Prince	Sunday-Aki	Prince	Sunday-Aki	Prince	Sunday-Aki
Callus cell	1.50	1.68	3.61	2.80	2.40	1.67
Embryo	1.30	0.55	4.35	3.09	3.35	5.52
Plantlet	1.72	1.23	—	—	—	—

春系3号'を外植片として用いた場合、2、4-D、NAAおよびIAAなどの各種オーキシンにより誘導することが可能であり、各オーキシンにより誘導された不定胚の中でIAAにより誘導された不定胚からの植物体再生が特に良好であると述べている(Tabeiら1991)。これは、IAAにより、植物体を再生しやすい倍数性の低い不定胚が多く誘導されていることを示唆するものと考えられる。そこで、著者は本研究の主な植物材料である'プリンスメロン'を用いて各種オーキシンにより不定胚誘導を試み、オーキシンの種類と誘導された不定胚の倍数性との関連について明らかにしようとしたが、'プリンスメロン'では2、4-Dを添加した培地以外では不定胚の誘導はできなかった(未発表)。今後は、メロンの不定胚形成培養系を改良するにあたり、不定胚の誘導方法と誘導された不定胚の倍数性について検討する必要があると考えられる。

3 四倍体由来外植片の培養における不定芽および不定胚誘導と植物体再生

メロンの二倍体を用いた不定芽形成培養系ではカルス細胞の倍数性変異の幅が培養過程の進行に従って半数性から九倍性以上の高次倍数性まで急速に拡大したが、再生植物体は二倍体、四倍体および二倍性細胞と四倍性細胞をもつ混数体のみであった。不定胚形成培養系でも、カルス細胞の倍数性の変異幅は半数性から九倍性以上の高次倍数性まで拡大したが、不定胚段階では、二倍性、四倍性および八倍性の細胞が観察された。更に、再生植物体はいずれも二倍体または四倍体であった。従って、メロンの組織培養では二倍性または四倍性細胞から選択的に植物体が再生するものと考えられる。この考察が正しいとすれば、四倍体メロンを外植片として不定芽形成または不定胚形成培養系で培養し、植物体を再生させた場合、再生植物体の殆どは四倍体となると推測される。

そこで、本節では、四倍体メロンから外植片を採取して不定芽形成および不定胚形成培養系で培養し、再生した植物体の倍数性を調査することにより、この仮説の妥当性について検討した。更に、二倍体および四倍体メロンを外植片とした培養の結果を基にしてメロンの組織培養で四倍体が高頻度に出現する理由について考察した。

材料および方法

(1) 供試材料

'サンデー秋'の完熟乾燥種子を用い第II章第1節で述べた方法により外植片を調製した後、同節の不定芽形成培養系により培養し、不定芽経由の再生植物体を得た。各植物体を栽培し、自殖により結実させた。果実形態(花落ち部の大きい偏平果実)により四倍体と判別できた果実(江面ら1992)から採種を行った。各果実から採種した種子の種子根の染色体観察の結果、四倍体と確認された系統を以下の培養に用いた。

(2) 不定芽形成および不定胚形成培養系

四倍体($4x=48$)系統(AsSAF-1とAsSAF-2)の完熟種子から外植片を調製し、前述(第II章第1節および第2節)の二倍体系統の不定芽形成および不定胚形成培養系で培養して植物体を再生させた。それぞれ培養4週間後に形成状況(不定芽または不定胚形成外植片率、外植片当たりの不定芽または不定胚形成数)を調査した。形成した不定芽および不定胚は、常法に従って植物体再生のための培養を行った。対照として'サンデー秋'の自殖種子($2x=24$)系統(SSAF)から調製した外植片を同様の培養系によって培養した。

(3) 再生植物体の染色体観察

不定芽または不定胚由来の再生植物体の根端細胞の染色体数を前述の方法に従って調査した。

結果および考察

四倍体メロン(系統AsSAF-1およびAsSAF-2)の子葉片を外植片として不定芽形成培養系で培養を行った場合、不定芽形成率はそれぞれ58.3%および65.0%であった(Table 12)。外植片当たりの不定芽形成数は、系統AsSAF-1およびAsSAF-2でそれぞれ0.98および1.35であった。一方、二倍体メロン(系統SSAF)を不定芽形成培養系で培養した場合、不定芽を形成した外植片は28.3%と少く、外植片当たりの不定芽形成数も0.62で少なかった。しかし、外植片当たりの植物体再生数は、四倍体系統でそれぞれ0.07および0.05といずれも低い値となった。また、二倍体では形成した不定芽からシュートが形成しなかった。再生植物体の染色体数を調べた結果、四倍体系統を外植片と

した再生植物体は7個体観察したが全て四倍体であった (Table 13)。異数体や混数体は確認されなかった。

Table 12. Morphogenesis through adventitious bud formation from tetraploid explants

Line	Ploidy	No. of explants cultured	% of explants forming adventitious bud mass	Adventitious bud mass/explant	Regenerated plantlets/explant
AsSAF-1	4x	60	58.3	0.98	0.07
AsSAF-2	4x	60	65.0	1.35	0.05
AsSAF-3	2x	60	28.3	0.62	0.00

Table 13. Chromosome number of regenerated plantlets from adventitious buds in tetraploid explants

Line of explant	Ploidy of explant	No. of regenerated plantlets examined	No. of plantlets confirmed
AsSAF-1	4x	4	4(4x=48)
AsSAF-2	4x	3	3(4x=48)
AsSAF-3	2x	—	—

四倍体メロン (系統 AsSAF-1 および AsSAF-2) の胚軸部を外植片として不定胚形成培養系により培養を行った場合、それぞれ 15.0% および 16.7% の外植片から不定胚が形成された (Table 14)。外植片当たりの不定胚形成数は、系統 AsSAF-1 と AsSAF-2 のそれぞれで 0.15 および 0.33 であった。一方、二倍体メロン (系統 SSAF) を不定胚培養系で培養した場合、不定胚形成外植片率は 43.3% と高い値を示した。外植片当たりの不定胚形成数も多く 1.03 であった。外植片当たりの植物体再生数は、四倍体系統ではそれぞれ 0.15 および 0.00 であり、二倍体系統では 0.10 であって、いずれも低い値となった。再生植物体の染色体数を調べた結果、四倍体系統を外植片とした再生植物体は観察した3個体の全てが四倍体であった (Table 15)。また、二倍体系統を外植片とした再生植物体は観察した3個体中2個体が二倍体、1個体が四倍体であり、異数体や混数体は確認されなかった。

四倍体メロンからの外植片を不定芽形成培養系および

Table 14. Morphogenesis through somatic embryo formation from tetraploid explants

Line	Ploidy	No. of explants cultured	% of explants forming somatic embryos	Somatic embryos/explant	Regenerated plantlets/explant
AsSAF-1	4x	20	15.0	0.15	0.15
AsSAF-2	4x	30	16.7	0.33	0.00
AsSAF-3	2x	30	43.3	1.03	0.10

Table 15. Chromosome number of regenerated plantlets from somatic embryos in tetraploid explants

Line of explant	Ploidy of explant	No. of regenerated plantlet examined	No. of plantlet confirmed
AsSAF-1	4x	3	3(4x=48)
AsSAF-2	4x	0	—
AsSAF-3	2x	3	2(2x=24), 1(4x=48)

不定胚形成培養系により培養し、再生した植物体の染色体数の観察を行ったが、実験の当初に予想したとおり全ての個体が四倍体となった。このことはメロンの組織培養では高次倍数性の細胞からの植物体再生が困難であることを示しており、不定芽形成培養系や不定胚形成培養系などの組織培養により五倍体以上の高次倍数体を得ることが困難であると考えられる。

メロンの不定芽形成培養系および不定胚形成培養系における再生植物体に四倍体が高頻度に出現する機構を解明するため、第1節、第2節では二倍体メロンを用い、また第3節では四倍体メロンを用いて各培養系で培養を行い培養細胞の倍数性の変化について観察を行った。その結果、メロンの組織培養では四倍体は以下の様な経過で高頻度に出現するものと考えられる。

1) 培養過程の進行に伴い、培養細胞における倍数性の変異拡大が急速に起こる。培養細胞の倍数性の多様化の原因としては、核内有糸分裂 (Sengupta and Sen 1987)、不等核分裂 (Ronichi ら 1992) や培養細胞の減数分裂的

な細胞分裂 (Ronichi ら 1992b) が報告されている。

2) 不定芽や不定胚の分化過程で、これらの多様な細胞中の二倍体とその正倍数体である四倍性および八倍性細胞から選択的に不定芽や不定胚が形成される。メロンでは特に四倍性細胞からの不定胚や不定芽の分化が良好である。この段階で培養細胞中に観察された異数性や他の倍数性細胞は排除される。

3) 更に、不定芽や不定胚からの植物体再生の段階で二倍性および四倍性の不定芽および不定胚から植物体が再生する。本実験における観察結果から倍数性の低い不定芽や不定胚は植物体として再生しやすいと考えられる。五倍性以上の細胞や異数性細胞からは植物体再生が極めて困難であると考えられる。不定芽または不定胚の分化およびそれからの植物体再生の段階で、多くの植物では、外植片の細胞と倍数性が異なる細胞は排除される (Senguputa ら 1987; Gimitter ら 1991)。しかし、メロンでは四倍体が排除されずに植物体として再生してくる。

4) その結果、メロンの組織培養における再生植物体には二倍体のほかに四倍体が高頻度に出現する。

V 倍数性変異の利用

メロンの細胞・組織培養による再生植物体の倍数性変異を調査した結果、不定芽由来の再生植物体には、多数の四倍体と、二倍性細胞と四倍性細胞の混数体が数パーセント含まれ、不定胚由来の再生植物体には多数の四倍体が含まれていることが明かとなった (第Ⅲ章)。一方、その他の倍数性や異数体は確認できず、不定胚形成や不定芽形成培養系によるそれらの作出は困難であると考えられた。

本章では、細胞・組織培養によって作出した四倍体を利用してその他の倍数体や異数体の作出を試みた。

1 組織培養により出現した四倍体の利用による三倍体の作出

Batra (1952) は、コルヒチンを用いて四倍体メロンを作出している。鈴木 (1958) と Nugent and Ray (1992) は、自然突然変異による四倍体メロンを観察した結果、四倍体メロンは二倍体メロンに比べて旺盛に生

育し、この特性はメロンの栽培に有効であると述べている。しかし、その果実は偏平となり、裂果しやすいことから営利的には利用できなかった。このような四倍体果実における不良形質は、倍数性を三倍体のレベルまで低下させれば改善できるものと考えられる。

一般に、三倍体植物は二倍体と四倍体の交雑によって作出される (村松 1987)。鈴木 (1959、1960) は、自然突然変異によって出現した四倍体メロンを栽培種の二倍体メロンと交雑することにより、三倍体メロンを作出することに成功している。藤下・柴田 (1990) はコルヒチン処理によって作出した四倍体メロンを利用して二倍体×四倍体の交雑を行い、得られた雑種胚を培養することにより三倍体の再生に成功している。

本節では、1) 組織培養によって得た四倍体メロンと栽培種の二倍体メロンを交雑し、得られた乾燥種子から取り出した発育不全胚を無菌的に培養することにより、三倍体メロンが効率的に作出できたこと、ならびに 2) 三倍体メロンの特性について報告する。

材料および方法

(1) 材料

二倍体メロン ($2x=24$) (*Cucumis melo* L.) である系統 GS 1 および Ad S 1 と四倍体メロンである系統 GE 46 および AsAd 9 を用いた。GS 1 および Ad S 1 はそれぞれ品種グリーンパールおよびアンデスの自植後代の固定系統である。系統 GE 46 および AsAd 9 はそれぞれ品種グリーンパールの不定胚およびアンデスの不定芽由来の再生個体の中に見いだされた四倍体の有性生殖による後代で、四倍性が安定して後代に伝わることを確認された系統である。

(2) 胚培養

二倍体メロンと四倍体メロンとの正逆交雑によって得た種子胚を用いた。即ち、個体当たり 3~4 の両性花に授粉を行い、結実した果実の中の 1 果のみを残し、他は摘果した。受粉 50~55 日後に各果実から種子を採取し、自然乾燥させた後、発育不全胚を取り出し、70% エタノールで 10 秒間、1% アンチホルミンで 15 分間表面殺菌後、滅菌蒸留水で 3 回洗浄した。これらの発育不全胚をショ糖 3%、寒天 0.8% を添加した MS 培地 (pH

5.8) (Murashige and Skoog 1962) 上に無菌播種した。25℃、16時間日長（白色蛍光灯、3,000 lx）下で3週間培養後、再生植物体数を計数した。これらの再生植物体の根端細胞の染色体数を第三章2-3の方法に従って調査した。

(3) 再生植物体の特性調査

再生植物体はポットに鉢上げし、常法に従って馴化を行った。馴化終了後、植物体は温室内に定植し、自殖を行った。しかし、それらは結実しなかった。そこで、授粉後柱頭にトマトトーン（石原産業）50mg/l処理を行い結実させた。各植物体について草勢、花粉稔性、果実の形態、裂果率、Brix値、成熟種子数を調査した。実生から育成した二倍体および四倍体も対照植物として栽培し、同様の事について調査を行った。

(4) 花粉稔性の調査

開花当日に各植物体から雄花を採取し、以下の二つの方法より花粉稔性の調査を行った。即ち、酢酸カーミンによる可染花粉の割合とショ糖10%を添加した1%寒天培地上での発芽率（25℃で1時間培養）によった。各方法では、1雄花当たり200粒の花粉を観察した。

結果

(1) 二倍体と四倍体の正逆交雑

株当たり3~4の両性花に受粉を行うことにより全ての植物体で結実した。Table 16は二倍体および四倍体メロンの正逆交雑による種子生産を示している。二倍体×四倍体の交雑で得られた果実は、多数の種子をもっていたが、成熟胚を含む種子は含まれていなかった。それらの種子は、多くが無胚であったが、一部の種子は子葉部分の発達が不完全な胚（以下、発育不全胚という。）（Fig.17-A）や異常に増殖した胚乳組織をもっていた。GS1(2x)×GE46(4x)およびAdS1(2x)×AsAd9(4x)の交雑では、発育不全胚の数はそれぞれ果実あたり33.8、77.8個であった（Table 16）。四倍体×二倍体の交雑でも、果実は多数の種子をもっていた。しかし、AsAd9(4x)×AdS1(2x)の交雑では胚を含む種子は全く含まれておらず、また、GE46(4x)×GS1(2x)の交雑では発育不全胚を含む種子が1個含まれているのみで、種子中に胚は全くみられなかった。

Table 16. Maturity of seed embryos produced by cross combination between diploid and tetraploid

Combination	No. of fruit examined	No. of seed per fruit	No. of variously developed seeds per fruit		
			With mature embryo	With immature embryo	Without embryo or with abnormally proliferated endosperm
GS1(2x) × GE46(4x)	4	492.0	0.0	33.8	458.2
GE46(4x) × GS1(2x)	6	293.2	0.0	0.2	293.0
AdS1(2x) × AsAd9(4x)	6	573.3	0.0	77.8	495.5
AsAd9(4x) × AdS1(2x)	2	251.0	0.0	0.0	251.0
GS1(2x)self	2	551.0	394.0	0.0	157.0
AdS1(2x)self	2	436.0	365.0	0.0	71.0
GE46(4x)self	2	265.0	90.0	0.0	175.0
AsAd9(4x)self	1	478.0	88.0	0.0	390.0

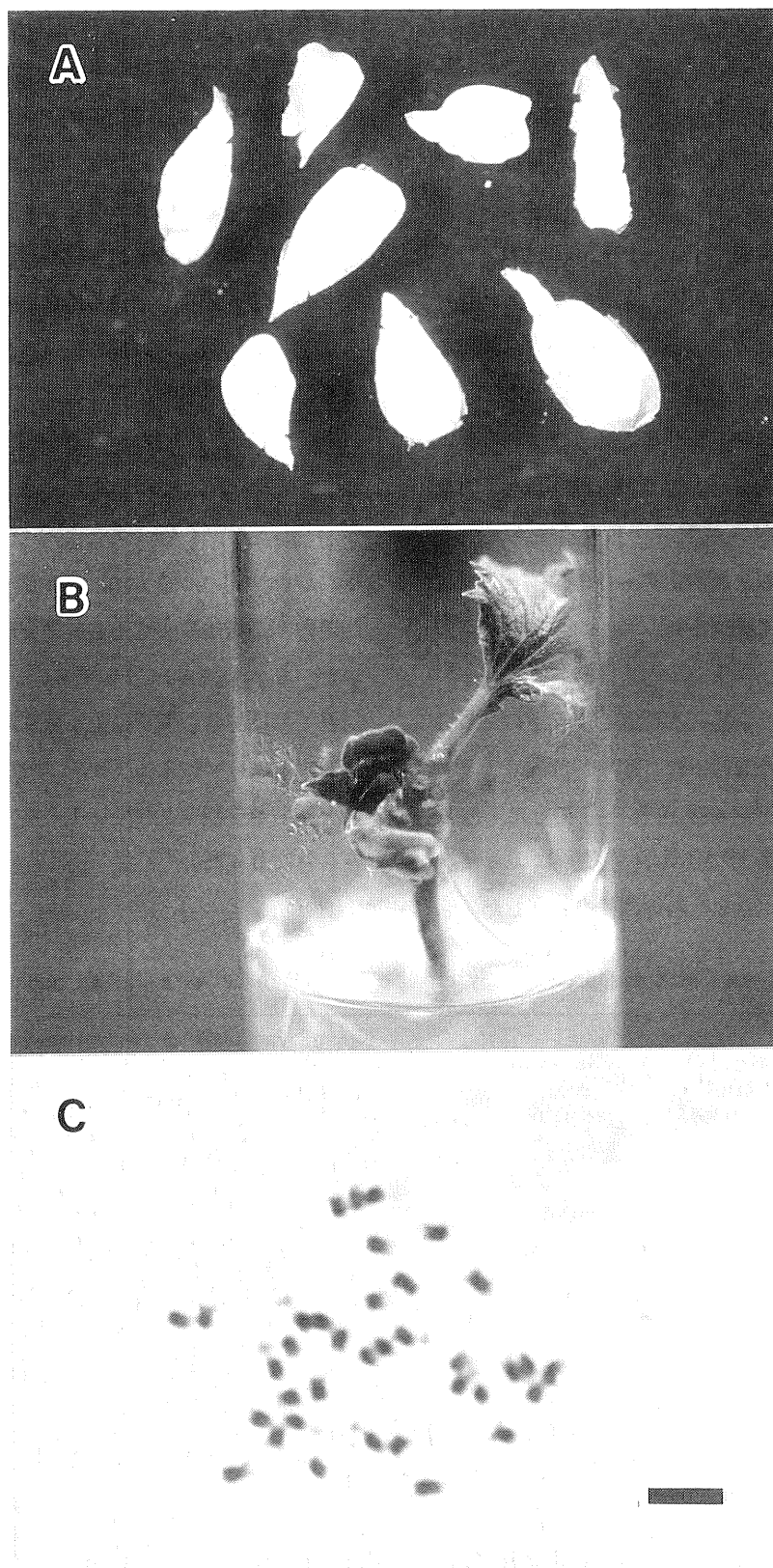


Fig.17. Plantlet regeneration from immature embryos derived from the diploid (GS 1) $\times$ tetraploid (GE46). A : immature embryos, B : regenerated plantlet, C : chromosome number ($3x = 36$). Bar in (C) indicates 5 μm .

(2) 発育不全胚からの植物体再生

発育不全胚を含む種子は通常の土壌への播種では発芽しなかった。そこで、種皮を取り除き、発育不全胚をMS培地上で無菌的に培養すると、GS1(2x) × GE46(4x) および AdS1(2x) × AsAd9(4x) の組み合わせで、それぞれ20%、22%の発育不全胚から植物体に再生した (Table 17)。生育した植物体の子葉は正常に展開しなかった (Fig.17-B) が、シュートが伸長し、正常な本葉が展開した。植物体にならなかった発育不全胚の中には、子葉展開後にシュートが伸長しなかったものやカルスを形成したものがあり、また、一部はそのまま褐変枯死した。再生植物体の根端細胞の染色体数観察を行ったところいずれも三倍体 (3x = 36) であることが確認された (Fig.17-C)。また、発根した植物体は、容易に馴化できた。

Table 17. Plant regeneration from immature embryos produced by the cross, diploid × tetraploid

Cross	No. of immature embryos cultured	No. of normal plants regenerated
GS1(2x) × GE46(4x)	110	22
AdS1(2x) × AsAd9(4x)	100	22

(3) 三倍体の特性調査

三倍体は二倍体より旺盛に生育した。その草勢は四倍体とほぼ同様であった。三倍体の花粉稔性は二倍体と四倍体に比べて低かった (Table 18)。酢酸カーミンによる可染花粉の割合は、GS1(2x) × GE46(4x) および AdS1(2x) × AsAd9(4x) の組み合わせで、それぞれ7%、12%であった。これらの可染花粉は、ショ糖10%添加寒天培地上では殆ど発芽しなかった。一方、二倍体と四倍体の花粉粒は、三倍体よりも多くのものが染色され、発芽率も高かった (Table 18)。三倍体は自殖では結実しなかったが、授粉後トマトーン (成分、パラクロルフエノキシ酢酸) で処理を行うと結実した。三倍体の果実の形態は、二倍体の果実に近く、球形となった (Fig.18)。Table 19 に三倍体の果実の

形質を示した。三倍体の果実の裂果率は、四倍体のそれよりも低下し、二倍体のそれよりも高かった。三倍体の果実の糖度を屈折糖度計で測定した場合の Brix 値は、GS1(2x) × GE46(4x) の組み合わせで7.0 ~ 12.0であり、AdS1(2x) × AsAd9(4x) の組み合わせでは8.0 ~ 15.2であった。三倍体の果実は多くの種子をもっていたが、胚はまったく含まれていなかった。

Table 18. Comparison of pollen fertility among diploid, triploid and tetraploid

Line and combination	Ploidy of plant	No. of plants examined	% of pollen grains stained*	% of pollen grains germinated*
GS1(2x) × GE46(4x)	3x	20	7	<1
AdS1(2x) × AsAd9(4x)	3x	20	12	<1
GS1	2x	10	92	73
AdS1	2x	10	96	58
GE46	4x	10	63	20
AsAd9	4x	10	63	29

*About 200 pollen grains were observed in each plant.

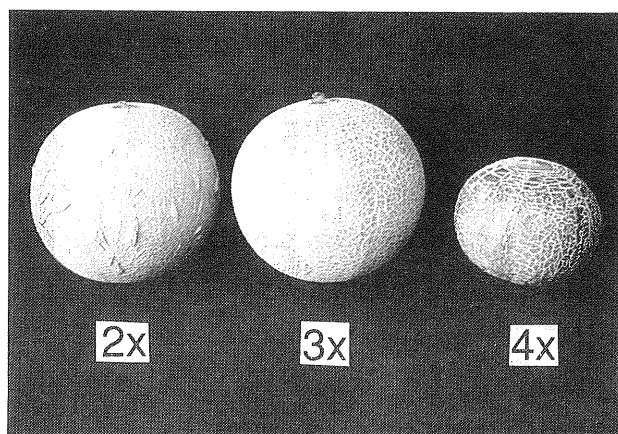


Fig.18. Comparison of fruit shape among diploid (AdS1), triploid (AdS1 × AsAd9) and tetraploid (AsAd9) plants.

Table 19. Characteristics of fruits in various polyploids of melon.

Line and combination	Ploidy of plants	No. of plants pollinated	No. of plants setting fruits	% of fruits cracked	Characteristics of fruits*		
					No. of fruit examined	Range of Brix value(%)	No. of mature seeds/fruit*
GS 1 (2x) × GE46(4x)	3x**	19	15	60.0	6	7.0—12.0	0
AdS 1 (2x) × AsAd9(4x)	3x**	20	19	21.1	15	8.0—15.2	0
GSI	2x	10	10	0	10	11.6—15.0	224.4
AdSI	2x	10	10	0	10	10.0—13.4	213.7
GE46	4x	10	10	80.0	2	11.4—13.2	16.0
AsAd9	4x	10	10	90.0	1	11.0	5.0

*Data were collected from fruits without cracking. Each plant was treated with Tomatotone solution (component : p-chlorophenoxy acetic acid) after self-pollination.

考察

一般に三倍体は二倍体と四倍体との交雑によって作出される(村松 1987)が、本実験では、二倍体と四倍体メロンの正逆交雑により成熟胚を含む種子は得られなかった。しかし、果実当たり 34～78 の発育不全胚を含む種子が得られた。これらの発育不全胚はMS培地上で無菌的に培養すると約 20 %が正常な植物体に発育した。GS 1 (2x) × GE 46 (4x) および Ad S 1 (2x) × AsAd 9 (4x) の組み合わせにおける三倍体作出数は、それぞれ果実あたり 6.8、17.2 個体であった。鈴木 (1959、1960) は自然突然変異により発生した四倍体メロンと栽培種の二倍体メロンの交雑を行い、得られた種子をは種したところ、二倍体 × 四倍体の組み合わせでは果実あたり 0.22 個体、四倍体 × 二倍体の組み合わせでは果実あたり 0.093 個体の三倍体を得た。従って、無菌培養により三倍体を作成する著者の方法は、従来の交配のみによる方法に比べて極めて効率的であると考えられる。

本実験で育成した三倍体メロンは、乾燥した種子から取り出した発育不全胚を培養することによって作出された。この場合、2 年間室温でデシケーター内に保存した交雑種子から取り出した 50 個の発育不全胚を無菌培養したところ、培養した発育不全胚の 44 %に相当する 22 個体の三倍体を得られた(未発表)。従って、三倍体作

出のために発育不全胚を含む乾燥種子を数年間は保存することが可能で、これを三倍体作出に利用できるものと考えられる。

前章で不定胚形成培養系や不定芽形成培養系が四倍体メロンを作成する有効な方法であることを示唆したが、本実験の結果から、組織培養によって作出したメロンの四倍体が、自然突然変異により発生した四倍体(鈴木 1958; Nugent and Roy 1992) やコルヒチン処理により作出した四倍体(藤下・柴田 1990) と同様に、三倍体の作出に有効であることが明かとなった。

三倍体メロンは、花粉稔性が低く、自殖のみでは結実しなかったが、授粉後に生長調節物質処理を行うと結実した。しかし、その果実から得られた種子は全て無胚種子であった。従って、三倍体メロンにおける結実現象は生育調節物質による単偽結果であると考えられる。

三倍体メロンの植物体の草勢は四倍体メロンに類似していた。一方、四倍体メロンの欠点であった果実が偏平となり裂果しやすい性質は、三倍体にすることにより改善された。鈴木 (1958) は、三倍体の果実の Brix 値は二倍体に比べて低い可能性があると述べている。しかし、本実験で作出された三倍体メロンの果実の Brix 値の範囲は、二倍体のそれと類似していた。従って、三倍体メロンを作成する場合、二倍体や四倍体親についての選抜と交配組み合わせを検討すれば、Brix 値の高い果実を

着ける三倍体メロンが得られるものと考えられる。

本実験により 1) 組織培養により高頻度に出現した四倍体が、自然突然変異やコルヒチン処理により人工的に作出した四倍体と同様に、三倍体メロンの作出に利用できること、および 2) 三倍体メロンは交雑法と胚培養とを組み合わせることにより効率よく作出できることが判明した。

2 三倍体を利用した異数体の作出

各種異数体は植物の遺伝分析に用いられる。一般に組織培養 (Yakuwa and Harada 1984 ; Kanda ら 1988 ; Feher ら 1989) や三倍体と二倍体とを交配すること (Wagen-voort and Lange 1975 ; Ahloowalia 1982) によって得られる。メロンの場合、各種の培養系により再生した植物体には、二倍体と四倍体がみられ、異数体は確認されなかった (第Ⅲ章)。また、予備実験でメロンの三倍体と二倍体とを交配したが、発芽力のある種子は得られなかった。

本節では前節で作出した三倍体と二倍体を交雑し、得られた種子を無菌的に培養することにより異数体を得られたので報告する。

材料および方法

(1) 材料

前実験で系統 A d S 1 (2x) × A s A d (4x) の胚を培養することにより得られた三倍体 (3x = 36) (以後 A A 系統と呼ぶ) と二倍体系統 A d S 1 (2x = 24) を用いた。

(2) 交配

無菌条件下で維持していた三倍体メロン (系統 A A) を常法により馴化した。二倍体系統 A d S 1 は種子から育苗した。各系統をパイプハウスに定植し、茨城県野菜耕種基準に従い抑制栽培の作型で栽培した。系統 A A (3x) × A d S 1 (2x) の交配を行って着果させ、摘果を行って 1 株当たり 2 果として栽培した。

(3) 交胚種子の無菌培養

交配 2、3、4、5 週間後の果実および成熟果実 (交配後 7 週間以上) から取り出した種子を前述の方法に従って表面殺菌し、ショ糖 3%、ゲルライト 0.4% を添加した M S 培地上に無菌播種した。1 シャーレ当たり

50 種子を播種した。成熟果実から取り出した種子の一部は、実験室内で 1 週間以上自然乾燥した後、同様に播種した。25℃、16 時間日長 (白色蛍光灯、3,000 lx) 下で培養し、1 週間および 3 週間後に発育状況を調査した。発育した胚状組織を取り出し、M S 培地に移植して培養を継続し、植物体を再生させた。

(4) 染色体数の調査

再生した植物体の根端を採取し、前述 (第Ⅳ章 2-3) の方法で染色体数を観察した。

結果

(1) 三倍体と二倍体の交配

三倍体 × 二倍体の交配では、29 の両性花に授粉を行い、着果数は 26 (着果率 90%) であった。

(2) 交胚種子の無菌培養

三倍体と二倍体の交配により通常の播種操作で発芽する種子が得られるとすれば、培養開始 1 週間後には発芽が観察される。そこで培養開始 1 週間後に観察を行ったが、いずれの時期 (発育段階) の果実から得た種子においても発芽するものは認められなかった。しかし、培養 1 週間経過後から、一部の種子で発芽口部分の内部に緑色の組織が観察され始めた。培養を継続すると、これらの組織は次第に大きくなり、やがて種皮が割れて内部から胚状の組織 (Fig.19-A) が現れた。胚状組織を種皮から取り出し M S 培地上で継代培養すると、一部はシュートを形成し植物体にまで発育した (Fig.19-B)。その他は、発育異常となり正常な植物体にはならなかった。

胚状組織は、交配 2 週間後の果実の種子から成熟果実の種子まで全ての種子を培養した場合に得られた (Table 20)。果実の発育段階別に採取した種子の胚状組織の形成率は 0.6~1.7% となり果実の発育段階による大きな差は認められなかった。しかし、成熟果実から取り出した種子を自然乾燥してから培養すると胚状組織の形成率は大きく低下し、0.06% となった。再生植物体は、交配 2、4、5 週間後の果実または交配後 7 週間以上経過した成熟果実から種子を取り出して培養したときに得られた。胚状組織形成種子率は 0.2~0.5% であった。

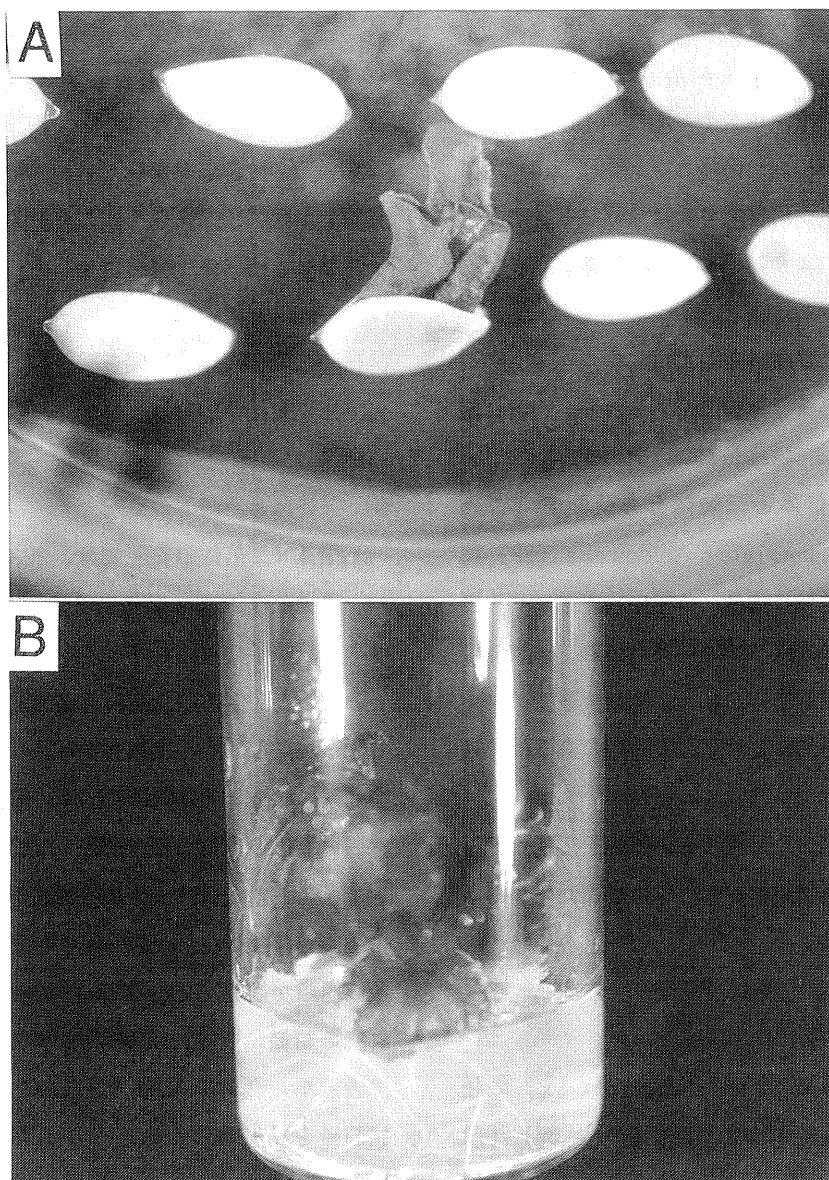


Fig.19. Embryo-like tissue (A) developed from a seed obtained by triploid x diploid cross, and a plantlet (B) regenerated from the tissue.

Table 20. Plantlet regeneration from the seeds obtained in the cross, triploid x diploid*

Weeks after pollination	No. of fruits examined	No. of seeds cultured (S)	No. of embryo-like organs developed(E)	E/S (%)	No. of regenerated plantlets(P)	No. of plantlets rooted
2	2	500	7	1.4	2	1
3	3	1,116	7	0.6	0	—
4	3	1,352	23	1.7	7	3
5	3	1,536	15	1.0	7	1
7<	2	849	14	1.6	2	0
7<+dry*	4	1,792	1	0.06	0	—

*Rescue culture was applied to germination and development of immature seeds.

**Seeds collected from mature fruits were dried at room temperature before the culture.

(3) 染色体数観察

再生植物体の染色体数の観察結果はTable 21 のとおりであった。伸長した18本のシュートの中で5本が発根した。発根しなかった13本のシュートは、1/2 MS培地に継代を繰り返したが発根せず、一部は継代中に褐変枯死した。根端細胞の染色体数観察の結果、発根した5個体中4個体が異数体であった。異数体の染色体数は、それぞれ $2n = 27$ 、35、45および46本で、残りの1個体は、 $2n = 48$ の四倍体であった (Fig. 20)。この場合、三倍体と二倍体の交配により得られた14個 (2個/株) の果実から取り出した種子5、353を培養して4個体の異数体が作出され、概ね1株当たり0.57

個体の異数体が得られたことになる。

Table 21. Chromosome number of root tip cells of regenerated plantlets from seed produced by the cross, triploid x diploid

Developmental stage of fruit (Weeks after pollination)	No. of plantlets examined	No. of plantlets				
		Chromosome number				
		27	35	45	46	48
2	2			1		
4	7	1			1	1
5	7		1			

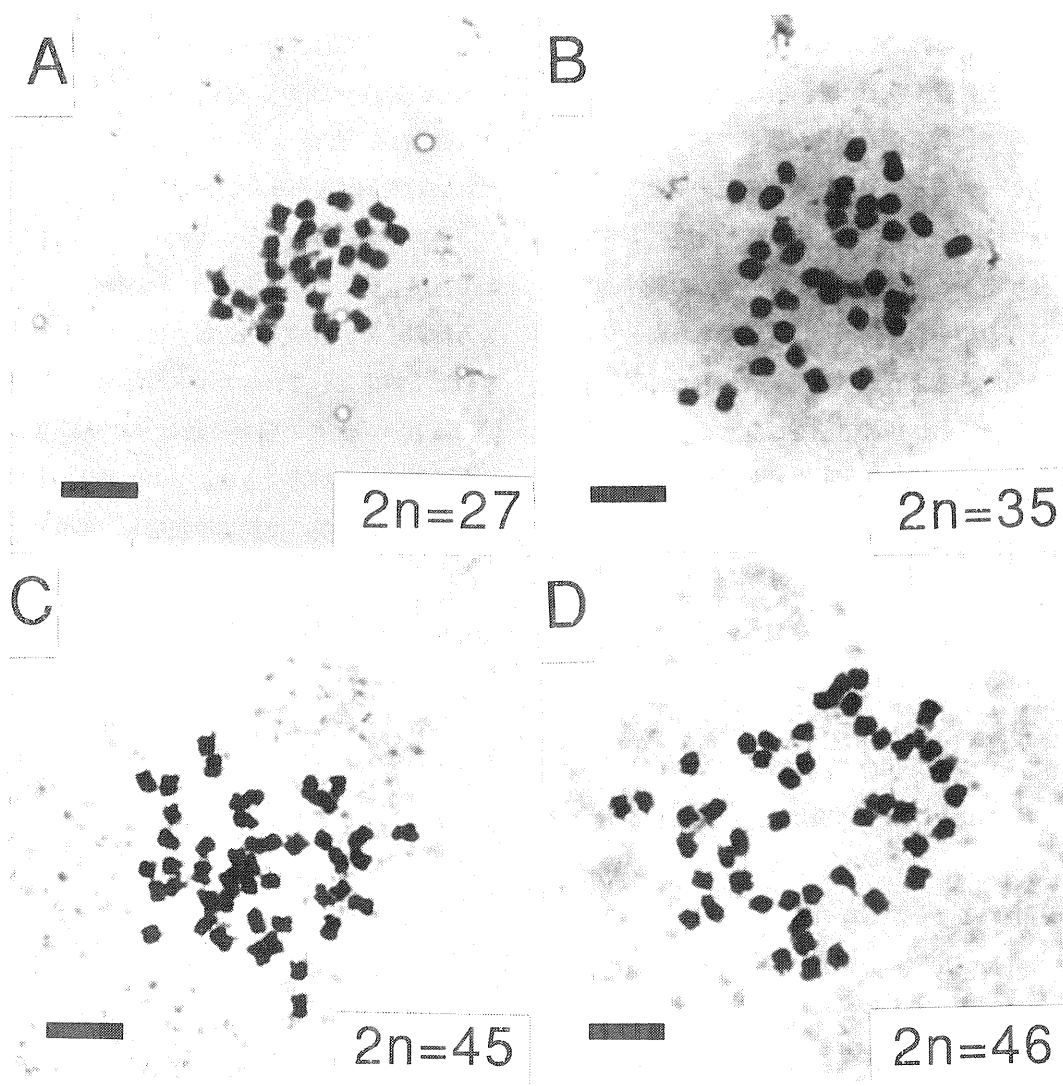


Fig.20. Chromosome of root tip cells of regenerated plantlets from seeds obtained by the triploid x diploid cross.
Bars: 5 μm

考察

イネ (Kanda ら 1988)、アルファルファ (Feher ら 1989)、アスパラガス (Yakuwa and Harada 1984) などの作物では組織培養により異数体が作出されている。以前に著者はメロンの不定芽形成、不定胚形成、苗条原基形成、プロトプラスト培養系により再生した 1,000 個体以上の植物体の染色体数観察を行ったが、いずれも二倍体または四倍体で異数体は確認されなかった (Ezura ら 1992 a, b ; 有山ら 1992 ; Ezura and Oosawa 1993) ことから、メロンでは組織培養による異数体作出は非常に困難と考えられた。そこで、本研究では、三倍体メロンと二倍体メロンの交配により異数体を作出しようとしたが、成熟果実からは、通常の播種条件で発芽能力のある種子は得られなかった。しかし、三倍体の作出の場合と同様に三倍体と二倍体の交配種子を無菌的に培養を行ったところ、低率ではあるが異数体が獲得できた。異数体の獲得効率が低いことや交配に用いる三倍体は種子が得られないため *in vitro* 培養による栄養繁殖によって維持する必要があることなどの改善すべき点は残されているが、本研究の結果異数体獲得が困難であったメロンで異数体を獲得できるようになった。作出した異数体の特性調査を行うとともに維持方法を確立することにより、メロンにおいても異数体を利用した遺伝分析や育種が可能になると考えられる。

本節では、前節で作出した三倍体を利用していろいろな異数体が作出できることが明らかとなった。

VI 体細胞突然変異による低温伸長性個体の選抜

メロンは高温・乾燥を好む作物で日本では主にガラス温室またはパイプハウスなどの簡易施設を使用して栽培されている。茨城県においてもパイプハウスを用いた無加温栽培が行われている。この作型では 2 月下旬から 3 月上旬にかけて苗が定植され、6 月上旬を中心に出荷されている。定植後の生育初期から交配時期までは夜間の低温を回避する必要がある、各種被覆資材が多用されている。また近年、早期出荷を行うために作期が早くなっており、低温による果実肥大の不良などの生育障害が出ている。メロンの低温伸長性、特に低温下での果実肥大

性を改良することにより、これら生育障害の問題は解決されると考えられる。また、低温伸長性の良好なメロンが作出されると、通常の時期に栽培した場合でも被覆資材使用量を減らすことができ、資材費の軽減や栽培管理の省力化にも大きな効果がある。

本章では、第Ⅲ章の結果から体細胞突然変異の出現頻度が高いとみられる培養系である不定芽形成および不定胚形成培養系を利用して、低温伸長性、特に果実肥大性に優れた変異個体の選抜を試みた。

1 低温伸長性変異個体の選抜方法

体細胞突然変異の中から有用な変異個体を選抜する場合、より多くの個体を選抜に用いる必要がある。体細胞突然変異中から有用変異個体の選抜が行われてきたイネ (Adkins ら 1990)、コムギ、オオムギ (Wenzel and Foroughi-Wehr 1990) などのイネ科作物やダイズ (Stephens ら 1991) などのマメ科作物では、単位面積当たりの栽植個体数が多く、また栽培法も省力化されており、通常の栽培方法で多くの個体の特性検定を行うことができる。例えば、イネでは 10 a 当たりの栽植株数は 2 万株以上で、栽培方法も省力化されている。しかし、本研究で対象としているネット型露地メロンは単位面積、例えば 10 a 当たりの栽植株数は 600 株程度と少なく、また栽培方法も複雑である。そのためイネ科作物やマメ科作物のように多くの個体を栽培し、特性検定を行うことは非常に困難となる。

低温生育の良好な体細胞突然変異個体を選抜するには、選抜集団について低温下で栽培を行い、生育調査を行うことが必要である。しかし、メロンでは前述のように限られた労力とスペースで大量の個体検定は困難であるため、効率的な選抜方法の開発が必要となる。そこで、生育段階の早い時期での形質を指標に、低温下での果実肥大などに関する選抜ができれば、効率的な選抜が可能となる。

本節では、メロンの種子の低温発芽能力と低温生育特性の関係について調査し、種子の低温発芽能力を指標として低温生育特性に優れた変異体を選抜する方法について検討する。

材料および方法

(1) 種子の低温発芽性と低温生育特性との関係

品種アンデスを半促成栽培の作型で栽培し、自殖を行い採種した。その種子から胚を取り出し、吸水させた濾紙を敷いたシャーレに播種し、15、17、19、21℃で発芽処理した。5日後に発芽（幼根発生）したグループ（以下CTグループ）と発芽（幼根発生）しないグループ（以下CSグループ）に分けた。以後17℃で発芽の有無により分けた両グループを通常の方法に従って育苗し、パイプハウス内に定植した。通常の栽培温度より低温で管理し、以下の各事項の調査を行った。更に、栽培終了後に各グループの果実から採種し、17℃、5日間処理での発芽能力を上記のグループ分けと同様の方法で調査した。

種子のグループ分けは1991年11月28日から12月3

日にかけて行った。両グループの種子を12月3日に播種し、12月10日に鉢上げ後、1992年1月11日に定植した。定植後2週間は最低温度を8℃、以降は10℃で管理した。仕立て型は、立ち作りの1本仕立てとし、1果着けとした。その他の栽培方法は、茨城県野菜耕種基準に従った。

定植時に子葉上部の節数および草丈を測定した。定植15日後に各株の低温障害程度、定植48日後に節数増加および草丈増加量（cm）を測定した。収穫適期に果実を収穫し、重量を測定した。低温障害程度は以下の基準に従って外見より判定した。即ち、障害程度は 0：無障害、1：第1葉が黄化、2：先端部の本葉のみ無障害、3：枯死 とした（Fig. 21）。

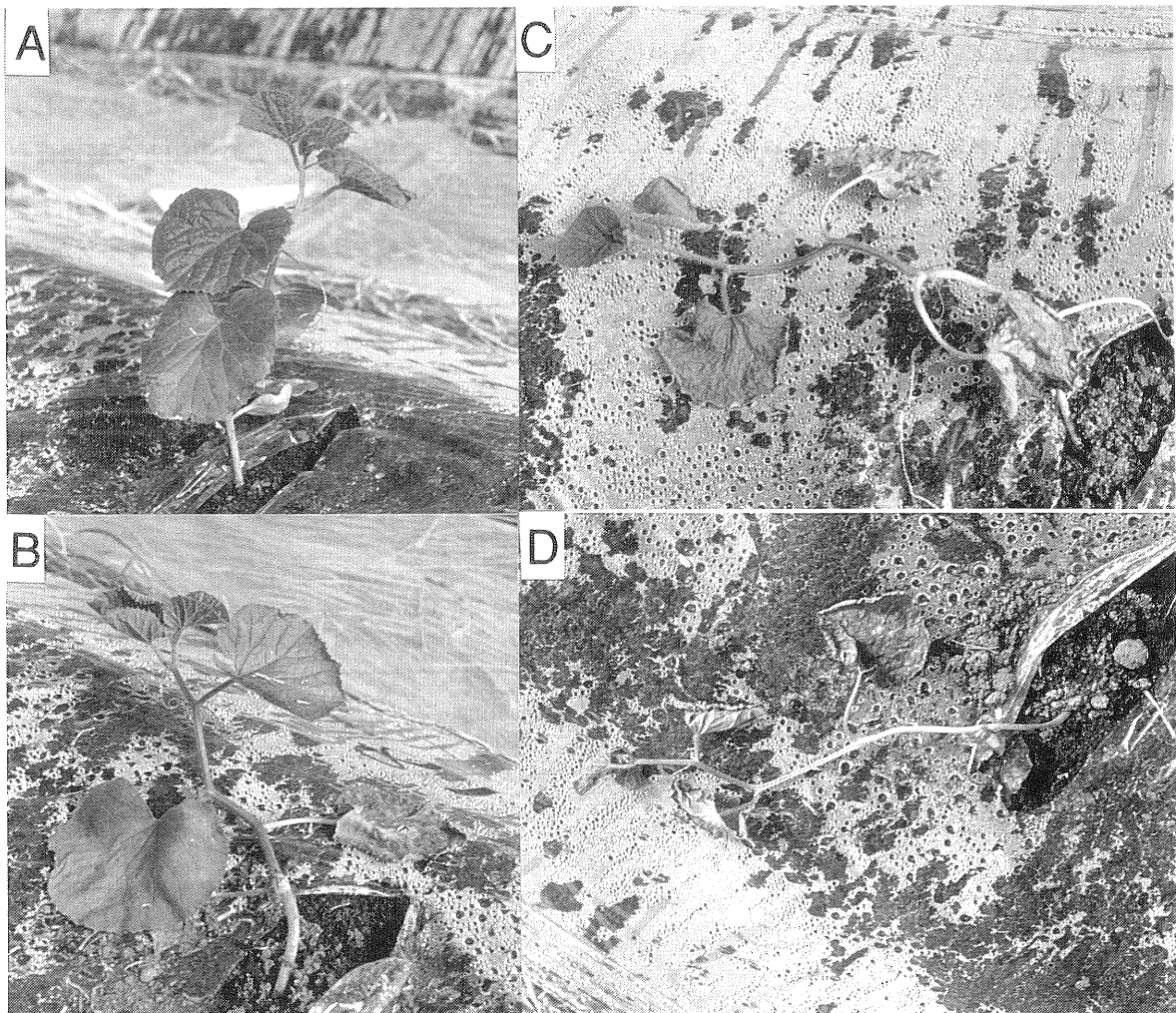


Fig.21. Degree of low-temperature injury of F_2 Seedlings of cv. Andes in green house.
A: non (0), B: yellowing of lowest leaf (1), C: survive only the top of the plants (2), D: death (3).

(2) 選抜目標温度の検索

メロンを低温期に栽培する場合、一般的には低温伸長性に優れた台木用カボチャに接ぎ木が行われるので台木用カボチャと同程度に低温伸長性が優れた個体を選抜する方法の開発を行った。即ち、台木用カボチャと茨城県で主に栽培されているメロンの種子の低温下での発芽能力を比較し、メロンが発芽せず台木用カボチャが発芽するような温度を検索し、選抜目標温度とした。

台木用カボチャとしては「新土佐」、「白菊」、「No. 8」を用い、メロンとして「プリンスメロン」、「アンデス」、「アムス」を用いた。これらは従来の栽培例により記載の順に低温伸長性が強いと考えられている。各品種の種子から取り出した胚を、シャーレ中の吸水させた濾紙の上に播種した。パラフィルムでシールし所定温度（15、16、17、18℃）の恒温器の中で発芽させた。5日後および10日後に発芽した胚の数を調査した。各区20粒の種子を供験した。

結果

(1) 種子の低温発芽性と低温発育性との関係

「アンデス」の自殖によって得られた種子は、15℃では全く発芽せず、17℃では21.1%、19℃では68.7%、21℃では99.6%が発芽した（Table 22）。17℃で発芽したグループ（以後CTグループと称する）は、不発芽グループ（以後CSグループと称する）に比べて定植後の幼苗期の低温障害程度が低かった（Table 23）。低温障害程度0の個体はCTグループが21.8%であったのに対し、CSグループでは4.9%とその差は顕著であった。低温障害程度1の個体は両グループともほぼ同率であったが、低温障害程度2と3の個体は、CTグループがCSグループに対して10%程度少なかった。低温障害程度3の株は調査時に

Table 22. Effect of temperature on germination rate of selfed seeds (cv. Andes)

Temperature (°C)	No. of seeds treated	% of seeds germinated
15	270	0.0
17	365	21.1
19	310	68.7
21	232	99.6

Table 23. Low-temperature tolerance in two groups of cv. Andes seedlings obtained from selfed seeds with different germinabilities at 17°C.*

Group of seedlings with different germinabilities**	No. of seedlings examined	Frequency of seedlings injured (%)			
		Index of injury**			
		0	1	2	3
CT	78	21.8	26.9	26.9	24.4
CS	82	4.9	24.3	36.6	34.2

*CT represents a group of seedlings which can germinate at 17°C for 5 days after sowing; CS, not germinated under the same condition.

**0: non injury, 1: yellowing lower leave, 2: normal upper leave, 3: mortality.

すでに枯死していたが、程度2の株もその後ほとんどのものが枯死した。

生育速度を節数や草丈の増加量で比較するとCT、CS両グループの間に顕著な差異は認められず、低温発芽性と節数または草丈の増加との間には有為な相関はないものと判断された（Table 24）。しかし、収穫果実の重量で比較するとCTグループが平均で846.7g、CSグループが652.0gであり、CTグループがCSグループに比べて顕著に大きかった。またその分布を比較するとCTグループは600g前後と1,100g前後の2つのピークが認められ、CSグループは700g前後の1つのピークが認められた（Fig. 22）。

Table 24. Growth in two groups of seedlings classified by germinability*

Seedling group	No. of node increased		Plant height increased (cm)	
	n	x	n	x
CT	42	6.6	41	13.9
CS	41	6.3	41	16.1

*Seedlings derived from selfed seeds of cv. 'Andes'. Measurement was carried out 48 days after planting.

**CT represents a group of seedlings which can germinate at 17°C for 5 days after sowing; CS, not germinated under the same condition.

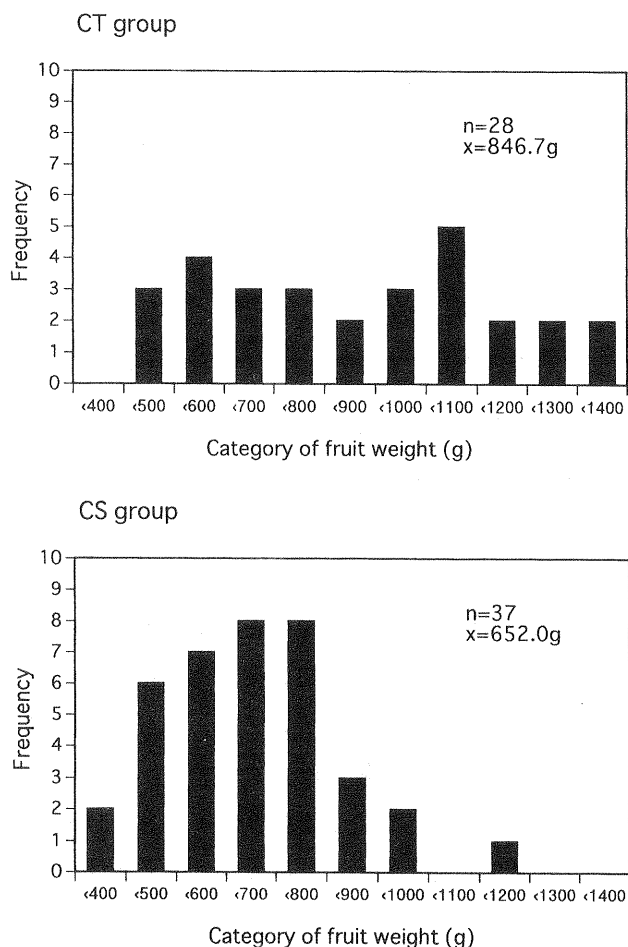


Fig.22. Distribution of fruit weight in two groups of seedlings derived from selfed seeds (cv. Andes). Measurement was carried out 50 days after pollination. CT represents a group of seedlings which can germinate at 17 °C for 5 days after sowing and CS not germinated under the same condition. "n" indicates number of samples.

次代の種子の低温発芽性についてみると、CTグループの自殖による次代種子の発芽率は、17 °C、5日間の条件下で、21.2 %であり、CSグループのそれは9.9 %となって、CTグループの次代種子の低温発芽能力がCSグループの次代種子のそれに比べて顕著に高かった (Table 25)。

(2) 選抜目標温度の検索

各種子の播種5日後 (Fig.23 - A) および10日後 (Fig.23 - B) の発芽状況から、用いたメロン3品種の発芽を完全に抑制する温度は15 °Cであった。一方、

Table 25. Low-temperature germinability (at 17 °C, after 5 days) of selfed seeds (F_2) obtained from each group (CT or CS) of cv. Andes seedlings (F_1).

Group*	No. of seeds treated**	Germination rate (%)
CT	670	21.2
CS	1229	9.9

*CT represents a group of seedlings which can germinate at 17 °C for 5 days after sowing; CS, not germinated under the same condition.

**A total of 670 seeds were derived from 15 fruits in CT group; 1229 seeds from 30 fruits in CS group.

台木用カボチャは、15 °Cでは '新土佐' の発芽率が5日後に25 %、10日後に90 %となり、'白菊' のそれは5日後に0 %、10日後に75 %であった。'No. 8' はいずれの場合にも発芽しなかった。次に、16 °Cの場合についてみると、メロンでは、'プリンスメロン' が5日後に5 %、10日後に60 %の発芽率を示し、'アンデス' が5日後に0 %、10日後に5 %となった。'アムス' はいずれの場合も発芽しなかった。一方、台木用カボチャでは、'新土佐' および '白菊' が5日後に100 %の発芽率を示し、'No. 8' が5日後に5 %、10日後に100 %を示した。17 °Cにおいては、'プリンスメロン' の発芽率は5日後に95 %、10日後に100 %となり、'アンデス' では5日後に20 %、10日後に95 %となり、'アムス' では5日後に10 %、10日後に90 %の発芽率を示した。台木用カボチャは5日後には全ての品種が発芽した。更に、18 °Cでは5日後にメロンおよび台木用カボチャの全ての品種がほぼ100 %の発芽率を示した。以上の発芽試験の結果から、メロン3品種と台木用カボチャ3品種の低温発芽能力は、新土佐>白菊>No. 8 >プリンスメロン>アンデス>アムスの順で大きいと判断された。

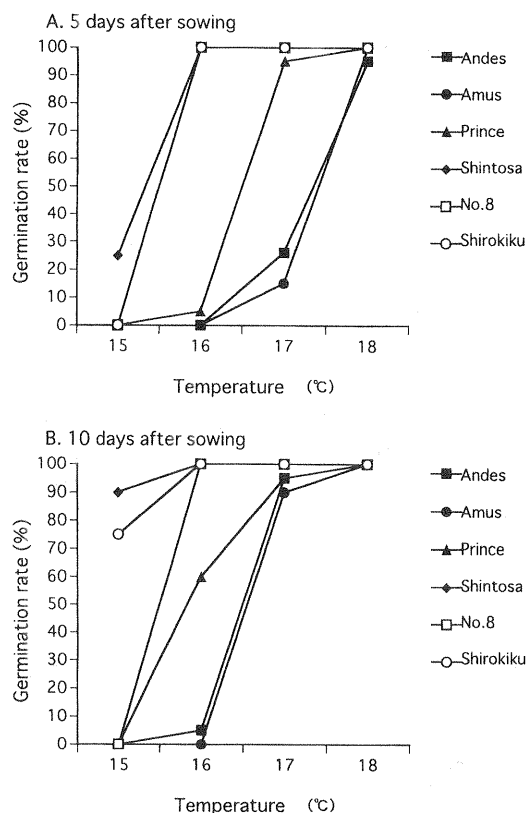


Fig.23. Low-temperature germinability of cvs, Andes, Ams and Prince (melon) and *Cucubita* strains used for stock (cv. Shintosa, No.8 and Shirorootkiku).

考察

メロンは単位面積当たりの栽培株数が少なく、また栽培方法も煩雑である。このような作物において低温伸長性に優れた変異個体を選抜するには効率的な選抜方法が必要である。そこで低温伸長性変異個体の選抜をするため低温発芽性を指標とした選抜方法について検討した。

本実験では、植物体の低温伸長性を測定するパラメーターとして草丈と節数の増加量および果実重量を用いた。低温発芽性の異なるメロンの2つの個体群についてこれらの値を測定したが、両個体群間の草丈と節数の増加量に有意な差異は認められなかった。従って、低温発芽性と草丈および節数の増加量のとの間に有意な関係はないと判断された。Edelsteinら(1991)の報告においてもメロンの低温発芽性と植物体の初期生育には有意な相関は認められておらず、本研究の結果もそれと一致するものであった。

Table 26. Characteristics expected in melon plants selected by low temperature germinability.

Germination at low temperature	Growth at low temperature	Type
yes	yes	1
yes	no	2
no	yes	3
no	no	4

一方、低温発芽性と果実重量とのあいだには、一定の傾向が認められた (Fig. 22)。低温発芽性と低温下での果実肥大性をパラメーターとしてメロンの分類を行うと、Table 26 に示したような4タイプに分類される。即ち、低温発芽性と果実肥大性が一致する個体群 (タイプ1)、低温発芽性を有するが果実肥大性のない個体群 (タイプ2)、低温発芽性はなく果実肥大性のある個体群 (タイプ3) および低温発芽性と果実肥大性のいずれも認められない個体群 (タイプ4) の4タイプである。低温発芽性の優れた個体群 (CTグループ) の果実重量の分布には1, 100g前後と600g前後の2つのピークが認められた。上述の分類に当てはめると、1,100g前後にピークを示す個体群はタイプ1であり、600g前後にピークを示す個体群はタイプ2であると考えられる。また、低温不発芽群 (CSグループ) は、果実重量700g前後にピークがありタイプ4と考えられる。また、タイプ3に相当する個体群は本実験では認められなかった。アンデスの自殖種子からの母集団中で17℃で発芽する種子は約20%、発芽しない種子は約80%であった。従って、低温発芽性を指標に選抜することで、母集団の中から果実肥大が不良な個体を多量に排除することが可能と考えられる。また、低温発芽性により選抜した個体群には低温発芽性はよいが果実肥大が不良な個体 (タイプ2) が約半数含まれており、低温下での果実肥大性に優れた個体 (タイプ1) のみを選抜するには圃場段階での最終的な選抜操作が必要であると考えられた。しかし、17℃での低温発芽性による選抜を行うことで、圃場段階での選抜対象個体数を母集団の20%にまで大きく減らすことが

でき、低温下での果実肥大性に優れた変異個体の効果的な選抜が可能であると考えられる。本実験では、17℃での発芽性により選抜することで、選抜母集団の約80%を圃場段階の選抜を行わずに排除することができた。更に、低い温度で選抜を行うことにより低温下での果実肥大性の良好な個体を効率的に選抜することが可能であると考えられる。

メロンおよび台木用カボチャの各3品種を用いた発芽試験の結果は、各品種の従来の栽培試験の結果から判明している生育段階での低温伸長性と一致していた。従って、種子の低温発芽能力により低温伸長性が判別できるものと予想される。また、用いたメロン品種の種子では、15℃で5日後に発根するものは全く認められず、台木用カボチャ品種の種子では、同条件で発芽が認められたことから、この条件で選抜することにより、台木用カボチャと同等以上の低温伸長性を有するメロン個体の選抜が可能であると考えられる。台木カボチャ以上の低温伸長性を有するメロンの系統が選抜できれば、接ぎ木の必要がなくなり、栽培の省力化が可能になる。また、台木カボチャに接ぎ木すると果実の品質が低下することが知られているが、接ぎ木を行わずに栽培できれば、果実の品質面での効果も期待できる。以下では、この条件下で組織培養により再生した植物体の後代の中から、低温伸長性、特に果実肥大性に優れたメロンの選抜を試みた。

2 培養系を利用した低温発芽性個体の選抜

倍数性変異では、不定芽形成および不定胚形成培養系が変異出現頻度の高い培養系であることが明らかとなった(第三章)。また、メロンでは低温発芽性を指標として選抜することで、選抜母集団から果実肥大の不良な個体を排除でき、その結果として低温伸長性、特に果実肥大の良好な個体の効率的な選抜が可能であることが示された(本章第1節)。

本節では、メロンの不定芽形成および不定胚形成培養系により再生した個体の後代から低温発芽性に優れた個体の選抜を行った。

材料および方法

(1) 不定芽形成および不定胚形成培養系による再生植物体の後代の採種

‘アンデス’ および ‘アムス’ の完熟種子を用いて常法に従って不定芽および不定胚経由の再生植物体を得た。各個体を茨城県野菜耕種基準に従って半促成または抑制栽培の作型で栽培し、自殖を行い、再生個体の二倍体から採種した。対照として各品種の実生株を同様に栽培し、自殖を行い採種した。種子は採種後、1週間以上自然乾燥し、以下の選抜に用いた(Fig.24)。

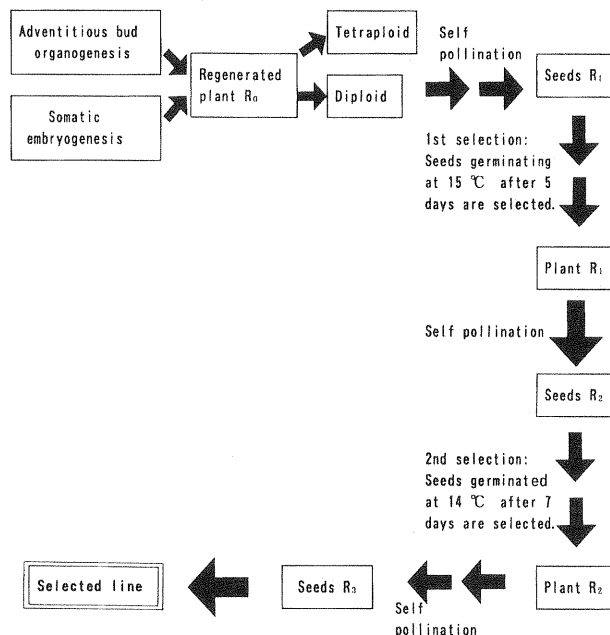


Fig.24. Selection process of somaclonal variants with a germinability at low temperature.

(2) 低温発芽性個体の選抜

乾燥種子の種皮を取り除き、胚を取り出し、吸水させたる紙を敷いたシャーレに播種した。1シャーレ当たり30胚を置床した。15℃で5日間処理した後、発芽した胚を選び一次選抜をした。選抜胚は、常法に従って育苗し、茨城県野菜耕種基準に従って栽培して、自殖により後代を採種した。種子は1週間以上自然乾燥し、以下の二次選抜に用いた。乾燥種子の種皮を取り除き、胚を取り出し、吸水させたる紙を敷いたシャーレに播種した。1シャーレ当たり30胚を置床した。14℃で7日間処理した後、発芽した胚を選び二次選抜とした。選抜胚は、常法に従って育苗し、茨城県野菜耕種基準に従って栽培して、自殖により採種した。採種した種子は自然乾燥し、以下の実験に用いた。

(3) 選抜系統の低温発芽性検定

‘アンデス’由来の再生個体の後代から二次選抜した47系統について低温発芽性の検定を行った。1系統当たり20種子を用い、各種子から胚を取り出し、吸水させたろ紙を敷いたシャーレに播種した。15℃で5日間処理した後、発育した胚の数を調査し、発芽率を算出した。更に、同じシャーレを室温下（概ね15～25℃）に24時間放置し、再び発芽した胚の数を調査し、発芽率を算出した。対照区として‘アンデス’の種子20粒を同様に処理し、発芽率を調査した。

結果

(1) 低温発芽性個体の選抜

‘アンデス’および‘アムス’の自殖種子をそれぞれ3,516粒および2,964粒、合計で6,480粒を一次選抜に用いたが発芽は全く認められなかった（Table 27）。

‘アンデス’の不定芽（AbAd）および不定胚（EAd）由来の再生植物体の次代種子は、それぞれ5,618粒および9,181粒を一次選抜に用い、それぞれ4粒（選抜率0.07%）および110粒（選抜率1.2%）が発芽した。

‘アンデス’由来の再生植物体の次代種子全体では、14,799粒のうち114粒が発芽し、選抜率は0.7%であった。‘アムス’の不定芽（AbAs）および不定胚（EAs）由来の再生植物体の次代種子は、それぞれ7,569

粒および5,737粒を一次選抜に用い、それぞれ13粒（選抜率0.2%）および12粒（0.2%）が発芽した。

‘アムス’由来の再生植物体の次代種子全体では、用いた13,306粒のうち25粒が発芽し、選抜率は0.2%であった。一次選抜全体では、28,105粒のうち139粒が発芽し、選抜率は、0.5%であった。

AbAd系およびEAd系の一次選抜個体の次代種子は、それぞれ374粒および3,717粒を二次選抜に用い、それぞれ無発芽（選抜率0%）および113粒（選抜率3.4%）が発芽した。‘アンデス’由来の一次選抜個体の次代種子全体では、4,091粒のうち113粒が発芽し、選抜率は2.8%であった。AbAs系およびEAs系の次代種子は、それぞれ1,346粒および761粒を二次選抜に用い、それぞれ24粒（選抜率1.8%）および17粒（選抜率2.2%）が発芽した。‘アムス’由来の一次選抜個体の次代種子全体では用いた2,107粒のうち41粒が発芽し、選抜率は1.9%であった。二次選抜全体では、6,198粒のうち154粒が発芽し、選抜率は、2.5%であった。

(2) 選抜系統の低温発芽性の検定

二次選抜した‘アンデス’由来の47系統の次代種子における15℃、5日後の発芽状況はFig.25-Aのとおりであった。不定胚形成および不定芽形成培養系の外植片を取り出した‘アンデス’の種子が全く発芽しなかつ

Table 27. Process of selecting somaclonal variants with a low temperature-germinability

Stage of selection	Cultivars used**	Method of mother plant regeneration***	No. of seeds treated	No. of seeds germinated
1st	Ad	S	3,516	0
	As	S	2,964	0
1st	Ad	Ab	5,618	4
	As	Ab	7,569	13
	Ad	E	9,181	110
	As	E	5,737	12
	Ad	Ab	374	0
2nd	As	Ab	1,346	24
	Ad	E	3,717	113
	As	E	761	17

*Selection was made using selfed seeds derived from clonal plants which were regenerated through adventitious bud organogenesis on somatic embryogenesis.

**Ad: Andes, As: Ams,

***S: seedling, Ab: adventitious bud organogenesis, E: somatic embryogenesis.

た。一方、選抜した47系統中の11系統がそれらの元になっている品種と同様に全く発芽せず、他の36系統は発芽した。発芽した系統の発芽率は、10%から100%といろいろであった (Fig.25 - A)。特に、NO. 43とNO. 45は発芽が良好で、それぞれ用いた種子の90%および100%が発芽した (Fig. 26)。

15℃で5日間の発芽処理後さらに1日間室温 (15℃から25℃) で放置すると ‘アンデス’ の種子は15%が発芽した (Fig.25 - B)。選抜系統においては5日間発芽処理では全く発芽しなかった系統も急速に発芽した。その結果、47系統中45系統の種子が、培養の外植片を採取した元の ‘アンデス’ の種子以上の発芽率を示した。その中で多くの系統は、1日間の室温下放置で急速に発芽し、45系統中37系統の種子が100%の発芽率を示した。

考察

メロン品種アンデスおよびアムスの不定芽および不定胚経由の再生植物の次代種子 (S₁) 28,105粒 (総計) に15℃で5日間発芽処理を行ったところ、0.5%の種子が発芽した (一次選抜)。更に、この発芽種子から得た

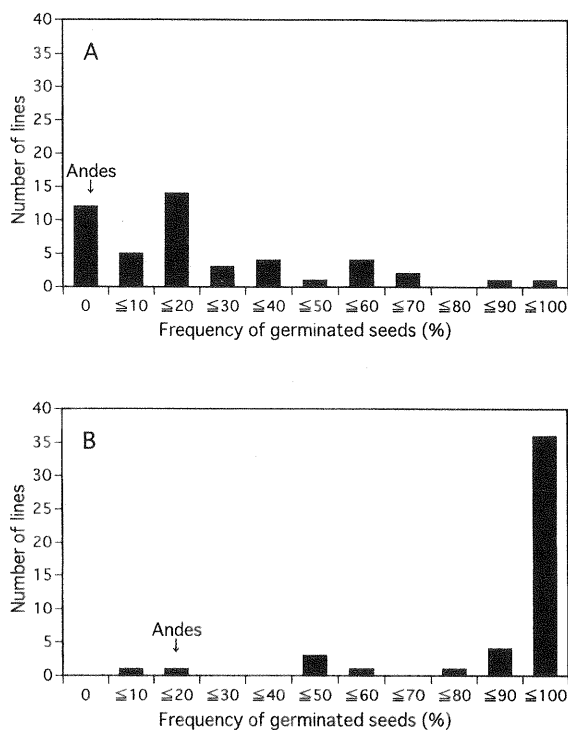


Fig.25 Low temperature-germinability of variants selected from selfed progenies of clonal plants propagated through tissue culture. A : at 15 °C, after 5 after days, B : at15 °C, after 5 days subsequently at roomtemperature for one day.



Fig.26. Germination of selected line No.45 at 15 °C for 5 days.
Right : No.45, Left : original cultivar Andes.

植物 (S_1) の次代種子 (S_2) 6,198 粒 (総計) について 14°C で 7 日間の発芽処理を行った結果、2.5 % が発芽した (二次選抜)。このように一次選抜より二次選抜で選抜率が上昇したことから、本実験で用いた選抜法が低温発芽性個体の選抜に有効であると考えられる。

本実験では組織培養の外植片を F_1 品種から取り出したが、以下のような理由から、選抜した低温発芽性個体は体細胞突然変異体である可能性が高いと判定した。用いた品種の S_1 種子を 6,000 粒以上選抜に用いたが全く発芽しなかった。もし、優性形質として低温発芽性の変異形質が元の品種の種子に含まれていれば、 S_1 種子の多くが発芽するはずである。また低温発芽性が劣性形質であれば、自殖をしているので S_1 種子では遺伝子がホモ化し、低温発芽する個体が出現してよいはずである。仮にそのような低温発芽性が完全浸透度をもつ劣性の 1 遺伝子による形質であれば自殖種子の 25 % が発芽し、2 遺伝子性であれば 6.25 %、3 遺伝子性であれば 1.23 % が発芽すると予想される。低温発芽性は、イネ (Sasaki ら 1973) では 4 以上、トマト (Maluf and Tigchelaar 1980) では 3 ~ 5 の遺伝子座に支配されていると推定されている。仮に ‘アンデス’ および ‘アムス’ において完全浸透度をもつ劣性の 3 遺伝子座により支配される低温発芽性があるとした場合、6,000 粒の S_1 種子を用いれば約 74 個の種子が発芽してよいことになり、劣性の 4 遺伝子により支配される低温発芽性があるとした場合でも約 19 個の種子が発芽すると考えられる。しかし、本実験で用いた ‘アンデス’ および ‘アムス’ の自殖種子は全く発芽しなかった。従って、外植片を取り出した ‘アンデス’ や ‘アムス’ は、この選抜条件において自殖種子を発芽させるような遺伝性をもつ可能性は少ないものと判断された。

‘アンデス’ の培養再生植物の後代から二次選抜した 7 系統から次代種子を採取し、 15°C 、5 日間発芽処理を行った場合の低温発芽能力を調査したところ、37 系統が、培養に用いた ‘アンデス’ の種子より高い発芽率を示した。従って、この時点では残り 10 系統が誤って選抜した低温発芽能力の低い系統と考えられた。しかし、更に、室温で 1 日間放置した場合、急速にそのうちの 8

系統が発芽するようになり、用いた ‘アンデス’ より高い発芽率を示した。従って、これらの系統に対しても選抜効果があり、残り 2 系統のみが誤って選抜した低温発芽能力の低い系統と考えられる。また、その他の系統においても急速に発芽が可能となり、全体では 47 系統中 37 系統が発芽率 100 % となった。更に、室温で 1 日間放置すると 47 系統全ての発芽率がほぼ 100 % となった。一般に、種子の発芽は、吸水、保存型 mRNA の活性化、酵素タンパク質の合成、代謝活性の発現、幼根の伸長という過程を経て進行する (南川 1984)。これらの一連の過程は種子内部の生理的なもので外観上の変化はないので、低温処理後に 1 日間室温で放置すると急速に発芽するようになった 11 系統や、急速に発芽率が向上したその他の系統では、低温処理中に、生理的な発芽過程が、‘アンデス’ よりも急速に進行していたものと考えられる。この点に関しては今後さらに生理学的な側面から検討を行う必要があり、これによって本実験で選抜できた低温発芽性機構の解明が可能になると思われる。種子の低温発芽性という形質は、作物栽培において極めて重要な形質の一つであり、これらの変異機構を解明することで他の作物の低温発芽性の改良が可能になるものと考えられる。

本実験で選抜系統の種子の低温発芽率が、選抜を繰り返すことにより増加したことから、低温発芽性は、遺伝変異であると判断される。また、選抜系統の低温発芽率が系統により 10 % から 100 % までいろいろであったことから、低温発芽性は、前述のイネやトマトの低温発芽形質と同様に複数の遺伝子座により支配された形質であると推定される。実際のメロンの育苗では発芽を揃えることがその後の栽培において重要となり、低温発芽性が良好であれば、種子の発芽がよくそろうようになる。今後さらに交配実験を行い、選抜したメロンの低温発芽性についての遺伝分析を行い、育種素材としての利用について検討する必要がある。

以上のことから、メロンでは不定芽形成および不定胚形成培養系において体細胞突然変異により低温発芽性に優れた個体の選抜が可能であると考えられる。

これらの選抜系統は、低温伸長性、特に低温下での果

実肥大性が良好であれば、育種的な利用価値が極めて大きいと考えられる。以下の節では、選抜系統の低温伸長性について検討を行った。

3 低温発芽性選抜個体の低温伸長性

本章で実施している選抜の最終的な目的は、低温下での果実肥大が良好な系統を選抜することにある。第1節の結果によると、メロンでは、低温発芽性の選抜により果実肥大の不良な個体を効率的に排除することが可能であった。一方、選抜された低温発芽性個体の中には果実肥大の良好な個体のほかに果実肥大の不良な個体も含まれており、圃場段階での最終的な選抜が必要と考えられる。

本節では、前節で低温発芽性により選抜した系統を低温期に栽培し、その低温伸長性について評価した。

材料および方法

(1) 材料

‘アンデス’から取った外植片を不定芽形成および不定胚形成培養系を用いて培養して再生した個体の後代から低温発芽性により選抜した47系統を用いた。

(2) 栽培及び生育調査

二次選抜した47系統について1系統あたり8株を育苗し、パイプハウス4棟で露地栽培を行った。各パイプハウスには2畝を作り、黒マルチを行い、株間30cmで定植した。初期生育調査日までは最低温度を12℃、最高温度を35℃として管理し、以後最低温度を10℃、最高温度を30℃として管理した。仕立て方は、1本仕立ての這い作りとした。1992年12月11日に播種し、28℃で発芽させた。播種4日後に温室内に移し、直径12cmのビニールポットに鉢上げし、地温が25℃となるように管理した。12月21日に鉢上げし、1993年1月27日に定植した。定植時に第4節まで残してそれより先端部を切除し、側枝の発達を促した。2月8日に第3節目と第4節目の側枝を残し、整枝した。2月10日に初期生育調査を行い、残した2本の側枝について節数および草丈を調査した。更に、2月15日に1本に整枝した。

3月3日に第2次の生育調査として、節数および草丈を調査し、第25節を残し摘心を行った。第10節から第15節目の両性花を目標に交配を行い、1株あたり2果を目標に着果させた。後日、着果節位、着果日および着果率

〔(着果数/着果目標数)×100〕を調査した。4月22日および5月10日に果実肥大(果実の縦径および横径)を調査した。果実は5月24日に一斉に収穫し、果実肥大(同上)および果実重量(g)を調査した。各果実の調査時に系統ごとの裂果率〔(裂果果実数/着果数)×100〕を調査した。その他の栽培方法は茨城県野菜耕種基準に従った。また、対照区として、組織培養の外植片を採取した‘アンデス’を各パイプハウス内に栽培して同様の調査を行った。

(3) 調査データの処理

各調査データは各パイプハウス内に定植した‘アンデス’のデータを基準として以下の方法で比較した。また調査データを基に果実の肥大速度を推定した。

1) 草丈の比較

‘アンデス’(対照)の値に対する2月10日および3月3日の比較系統の値の割合を以下の式により算出した。

2月10日の相対草丈(%)=

$$\frac{[(\text{比較系統第3節側枝長} + \text{比較系統第4節側枝長}) / (\text{アンデス第3節側枝長} + \text{アンデス第4節側枝長}) \times 100]}{}$$

3月3日の相対草丈(%)=

$$[(\text{比較系統側枝長} / \text{アンデスの側枝長}) \times 100]$$

2) 節数の比較

‘アンデス’(対照)の値に対する2月10日および3月3日の比較系統の値の割合を以下の式により算出した。

2月10日の相対節数(%)=

$$\frac{[(\text{比較系統第3節側枝節数} + \text{比較系統第4節側枝節数}) / (\text{アンデス第3節側枝節数} + \text{アンデス第4節側枝節数}) \times 100]}{}$$

3月3日の相対節数(%)=

$$[(\text{比較系統側枝節数} / \text{アンデス側枝節数}) \times 100]$$

3) 着果日数の比較

‘アンデス’(対照)の着果日を基準として次のように算出した。

$$\text{着果の早晚性} = \text{アンデス着果日数} - \text{比較系統着果日数}$$

[= 0 → 同日に着果

> 0 → 比較系統が早く着果

< 0 → 比較系統が遅れて着果]

4) 着果節位の比較

‘アンデス’ (対照) の着果節位を基準として次のように算出した。

着果節位の高低 = アンデス着果節位 - 比較系統着果節位

[= 0 → 同じ節位に着果

> 0 → 比較系統の方が低節位に着果

< 0 → 比較系統の方が高節位に着果]

5) 果実の大きさの比較

メロンの果実体積 (cm³) を楕円体と仮定し、以下の近似式により算出した。

$$\text{果実体積 (cm}^3\text{)} = 0.52 \times \text{縦径 (cm)} \times (\text{横径 (cm)})^2$$

更に、近似した果実重量は以下の式により基準化した。

$$\text{相対果実体積 (\%)} = [\text{比較系統果実体積 (cm}^3\text{)} / \text{アンデス果実体積 (cm}^3\text{)}] \times 100$$

6) 果実の肥大速度の比較

果実の肥大速度は、初期 (着果日～4月22日)、中期 (4月22日～5月10日) および後期 (5月10日～5月24日) に分け、以下の式により算出した。

$$\text{初期肥大速度 (cm}^3\text{/日)} = \frac{\text{4月22日の果実体積 (cm}^3\text{)} - \text{着果日から4月22日までの日数}}{\text{着果日から4月22日までの日数}}$$

$$\text{中期肥大速度 (cm}^3\text{/日)} = \frac{(\text{5月10日の果実体積 (cm}^3\text{)} - \text{4月22日の果実体積 (cm}^3\text{)})}{18 \text{ 日}}$$

$$\text{後期肥大速度 (cm}^3\text{/日)} = \frac{(\text{5月24日の果実体積 (cm}^3\text{)} - \text{5月10日の果実体積 (cm}^3\text{)})}{14 \text{ 日}}$$

さらに以下の式により基準化した。

$$\text{相対肥大速度 (\%)} = (\text{比較系統の肥大速度} / \text{アンデスの肥大速度}) \times 100$$

結果

(1) 選抜系統の低温下での生育量

‘アンデス’ の組織培養による再生個体の後代から選

抜した低温発芽性の47系統を低温管理下で栽培し、草丈と節数を指標として生育量を調査した。

選抜系統は、定植14日後の2月10日には2本の側枝を合せた総長で平均23.3～51.7 cmに伸長した。組織培養の外植片を採取した‘アンデス’に比べて51～152%の相対草丈であった (Fig.27-A)。用いた47系統中19系統が‘アンデス’以上の草丈を示した。また、‘アンデス’に対して110%前後の草丈を示す系統が最も多く、11系統であった。節数は2本の側枝の合計で平均6.3～11.5節であって、‘アンデス’に比べて67～133%の相対節数であった。用いた47系統中32系統が‘アンデス’以上の節数となった (Fig.27-B)。また、‘アンデス’に対して110%前後の節数を有する系統が最も多く、20系統であった。

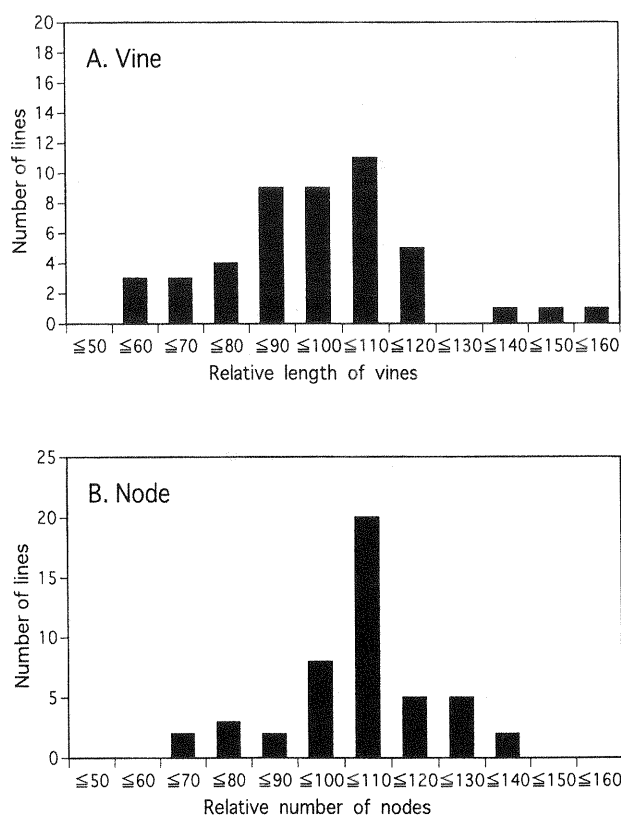


Fig.27. Distribution of plant length and node numbers in lines with a low temperature-germinability. Vine length and node numbers are represented as a value relative to the standardized value (100) of cv. ‘Andes’. The total of 47 lines used in the experiment are selected from progenies of clonal plants regenerated through tissue culture. Measurements are carried out on 10 February, 14 days of planting.

定植 35 日後の 3 月 3 日における選抜系統の草丈についてみると、平均 64.4 cm の系統から平均 121.8 cm の系統まであり、‘アンデス’ に比べて 69～126 % の相対草丈であった (Fig.28-A)。用いた 47 系統中 18 系統が ‘アンデス’ 以上の草丈を示した。また、‘アンデス’ と同じ 100 % 前後の相対草丈を示す系統が最も多かった。節数は平均 15.8 節の系統から平均 23.0 節の系統まであり、‘アンデス’ に比べて 79～115 % の相対節数であった。用いた 47 系統中 26 系統が ‘アンデス’ 以上の節数となった (Fig.28-B)。また、‘アンデス’ に比べて 110 % 前後の相対節数を有する系統が最も多く、23 系統であった。

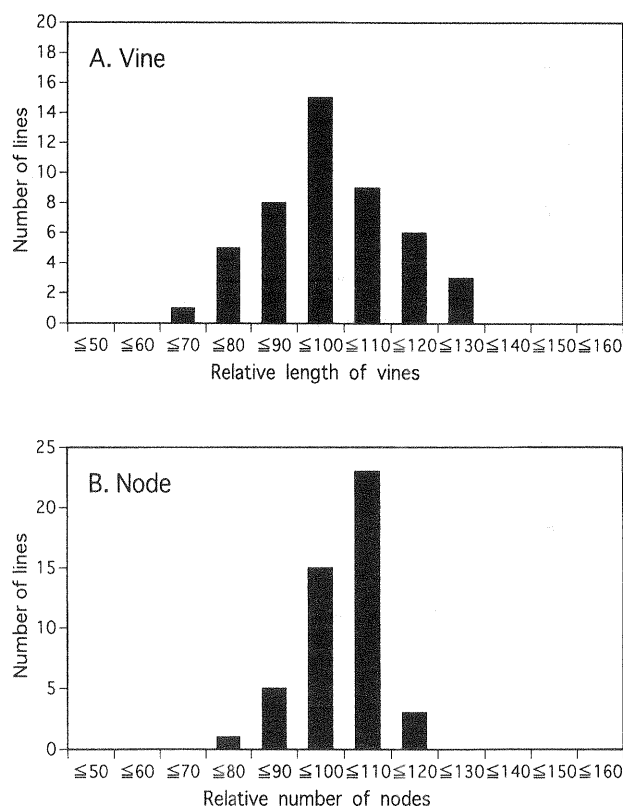


Fig.28. Distribution of plant length and node numbers in lines with a low temperature-germinability. Vine length and node numbers are represented as a value relative to the standardized value (100) of cv. ‘Andes’. The total of 47 lines used in the experiment are selected from progenies of clonal plants regenerated through tissue culture. Measurements are carried out on 3 March, 35 days of planting.

(2) 選抜系統の低温下での着果

交配は 3 月 15 日から 4 月 5 日の間に行った。系統ごとの平均着果日は 3 月 18 日から 28 日の間にあった。各パイプハウス内で見ると、対照とした ‘アンデス’ より約 8 日早い系統から 8 日遅い系統まで認められた (Fig. 29)。着果した 46 系統中 7 系統が ‘アンデス’ より早く着果した。また、‘アンデス’ より約 2 日着果の遅い系統が最も多く、14 系統であった。

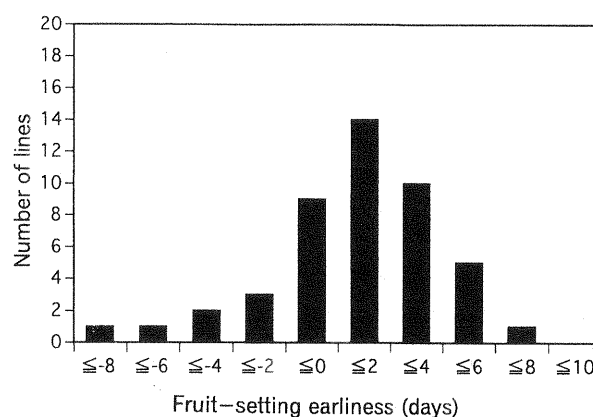


Fig.29. Fruit set earliness in lines with a low temperature-germinability. The earliness is represented as the deviation (in days) from the fruit-setting day in cv. ‘Andes’. The total of 46 lines used in the experiment are selected from progenies of clonal plants regenerated through tissue culture.

着果節位については、平均 11.7 節位の系統から平均 14.8 節位の系統までであった。対照とした ‘アンデス’ の節位を基準としてみると約 3 節下位の節位から約 3 節上位の節位までの間に着果した (Fig.30)。着果した 46 系統中 16 系統がアンデスより下位節に着果した。また ‘アンデス’ より 1 節上位に着果した系統が最も多く、13 系統であった。

各系統 8 株を定植し、1 株当たり 2 果として合計 16 果を着果させることを目標に交配を行った。系統ごとの着果率は 0～100 % までいろいろであった (Fig. 31)。特に着果率の低い系統が 10 系統認められた。これらの中には両性花が正常に着生し受粉したにもかかわらず着果しないタイプと、両性花の着生が不良なタイプが認められた。後者には系統 NO.32 のように側枝が発生しても、両性花が全く着生しない系統も認

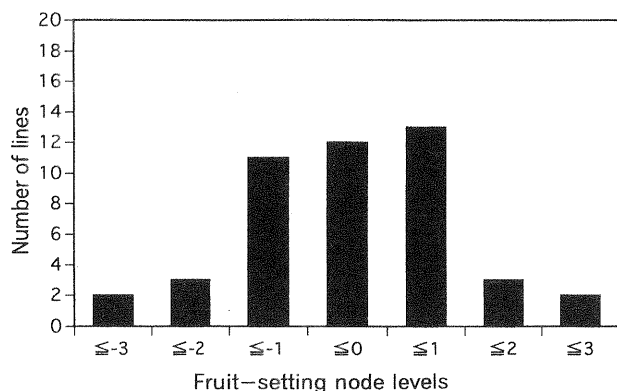


Fig.30. Fruit-setting node level of lines with a temperature-germinability. The node level is represented as the deviation (in node number) from the fruit-setting node of cv. 'Andes'. The total of 46 lines used in the experiment are selected from the fruit-setting node of cv. 'Andes'.

められた。その他の着果率の低い系統においても同様に両性花の着生が不良で、その結果交配数が少なくなり、着果率が低下した。また、これらの系統は初期生育（栄養生長）が旺盛であった。着果率が50%以下の10系統は、その系統の果実特性について調査不可能と判断し、以下の果実体積の調査からは除外した。

(3) 選抜系統の低温下での果実肥大

着果した果実体積の調査は、着果率が50%以上となった37系統について行った。第1回目は、交配約1ヵ月後の4月22日、第2回目は、交配約1.5ヵ月後の5月10日、最終の第3回目は交配約2ヵ月後の5月24日に行った。裂果の極めて多い系統が認められたので、各時期において系統ごとに裂果率も調査した (Fig. 32)。裂果率50%以上の高い値を示した系統が、4月22日、5月10日および5月24日にそれぞれ2系統、3系統および7系統確認された。なお、裂果率50%以上の系統については、正確な果実体積の測定が困難であったので、果実体積の解析からは除外した。裂果率が50%以上となった系統は、4月22日に2系統、5月10日に3系統、5月24日に6系統認められた。

4月22日における選抜系統の果実体積については、平均218 cm³ の系統から平均481 cm³ のものまであって、

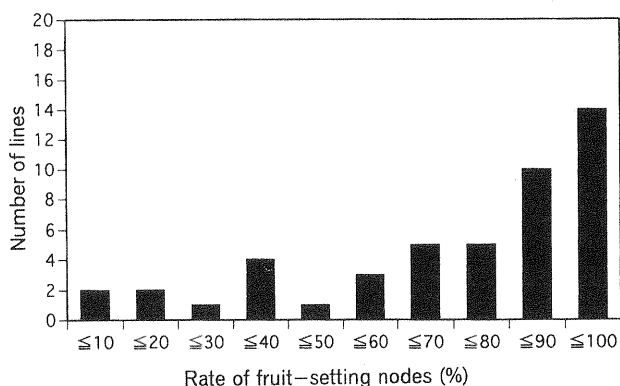


Fig.31. Distribution of fruit-setting node rates in lines with a low temperature-germinability. The total of 47 lines used in the experiment are selected from progenies of clonal plants regenerated through tissue culture.

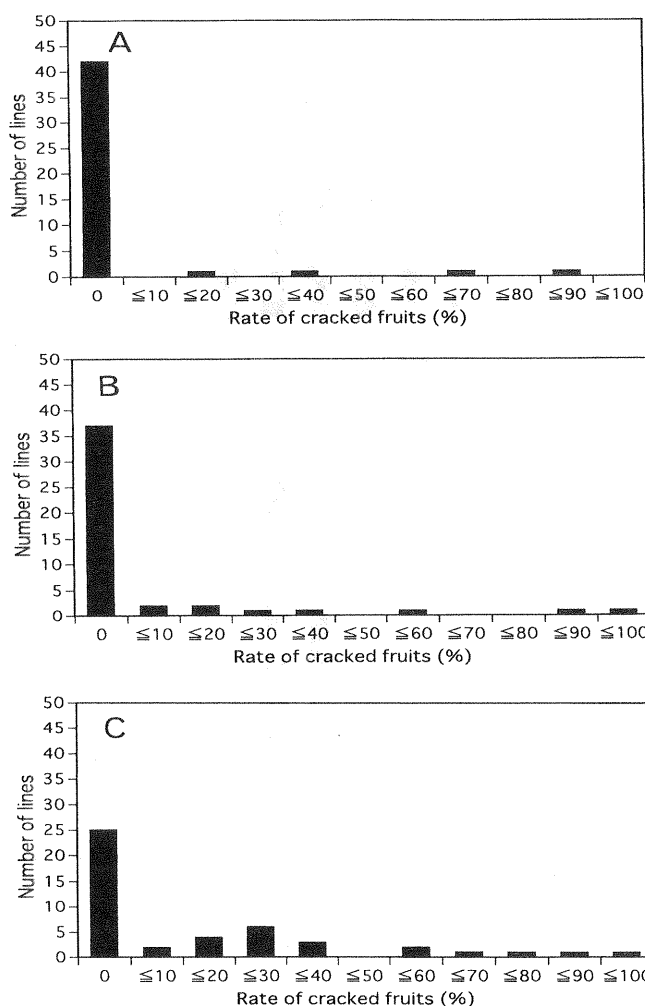


Fig.32. Distribution of cracked fruit rates in lines with a low temperature-germinability. The total of 46 lines used in the experiment are selected from progenies of clonal plants regenerated through tissue culture. (A): at early growth stage on 22 April, (B): at middle stage on 10 May, (C): at late stage on 24 May.

‘アンデス’ に比べて 64～134 % の相対果実体積であった (Fig.33 - A)。この場合、80 % 前後と 110 % 前後に分布のピークが認められた。調査できた 35 系統の 46 % に相当する 16 系統が ‘アンデス’ 以上の果実体積を示した。5 月 10 日における果実体積の系統ごとの平均値は、297～718 cm^3 の間にあり、‘アンデス’ に比べて 63～134 % の相対果実体積であった (Fig. 33 - B)。この場合、90 % 前後と 120 % 前後に分布のピークが認められた。調査できた 34 系統の 56 % に相当する 19 系統が ‘アンデス’ 以上の果実体積を示した。5 月 24 日における果実体積の系統ごとの平均値は 353～808 cm^3 の間にあり、‘アンデス’ に比べて 63～166 % の果実体積であった (Fig.33 - C)。この場合、90 % 前後と 110 % 前後に分布のピークが認められた。調査できた 31 系統の 48 % に相当する 15 系統が ‘アンデス’ 以上の果実体積を示した。特に、肥大の良好な系統が数系統選抜できた (Fig. 34)。

(4) 選抜系統の低温下での果実肥大速度

着果日から 4 月 22 日までにおける選抜系統の初期の肥大速度は 7.6～14.5 ($\text{g}/\text{日}$) の間にあり、‘アンデス’ に比べて 71～146 % の相対肥大速度であった (Fig. 35 - A)。調査できた 35 系統の 43 % に相当する 15 系統が ‘アンデス’ 以上の肥大速度を示した。4 月 22 日から 5 月 10 日までの中期の肥大速度は 3.0～16.0 ($\text{g}/\text{日}$) の間にあり、‘アンデス’ に比べて 62～302 % の相対肥大速度であった (Fig.35 - B)。調査できた 34 系の 65 % に相当する 22 系統が ‘アンデス’ 以上の肥大速度を示した。5 月 10 日から 5 月 24 日までの後期の肥大速度は 0.0～8.9 ($\text{g}/\text{日}$) の間であり、‘アンデス’ に比べて 0～174 % の相対肥大速度であった (Fig.35 - C)。調査できた 31 系統の 23 % に相当する 7 系統が ‘アンデス’ 以上の肥大速度を示した。3 回の調査時期を通じて調査した 31 系統のうち ‘アンデス’ よりも果実の肥大速度が大きかった系統は 4 系統であった。

(5) 低温発芽性と低温生育特性との相関

二次選抜した系統の 15 $^{\circ}\text{C}$ で 5 日間処理後に室温で 1 日放置した場合における低温発芽率、低温伸長性および

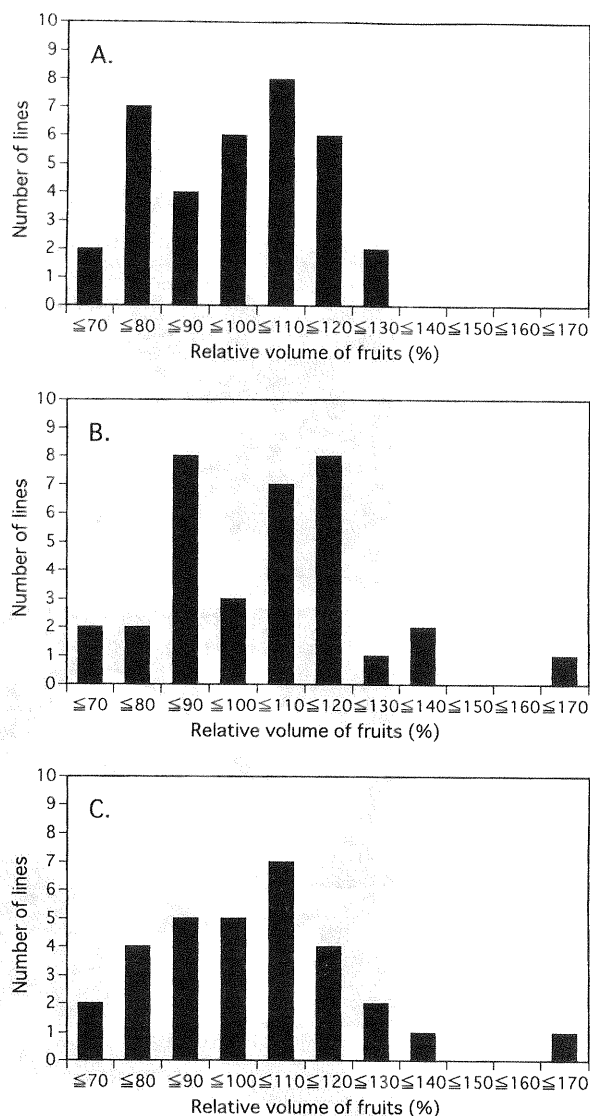


Fig.33. Distribution of fruit volume in lines with a low temperature-germinability. The fruit volumes are represented as a value relative to the standardized value (100) of cv. ‘Andes’. The total of 35, 34 and 31 lines used in the experiment are selected from progenies of clonal plants regenerated through tissue culture. (A) : at early growth stage on 22 April, (B): at middle stage on 10 May, (C) : at late stage on 24 May.

果実低温肥大性との相関を検討した結果は次のとおりである。

低温発芽率と 2 月 15 日における生育初期の草丈および節数には統計的に有為な相関は認められなかった (Fig.36 - A, B)。同様に低温発芽率と茎先端摘除直前の 3 月 3 日における草丈および節数にも統計的に有意な相関は認められなかった (Fig.37 - A, B)。

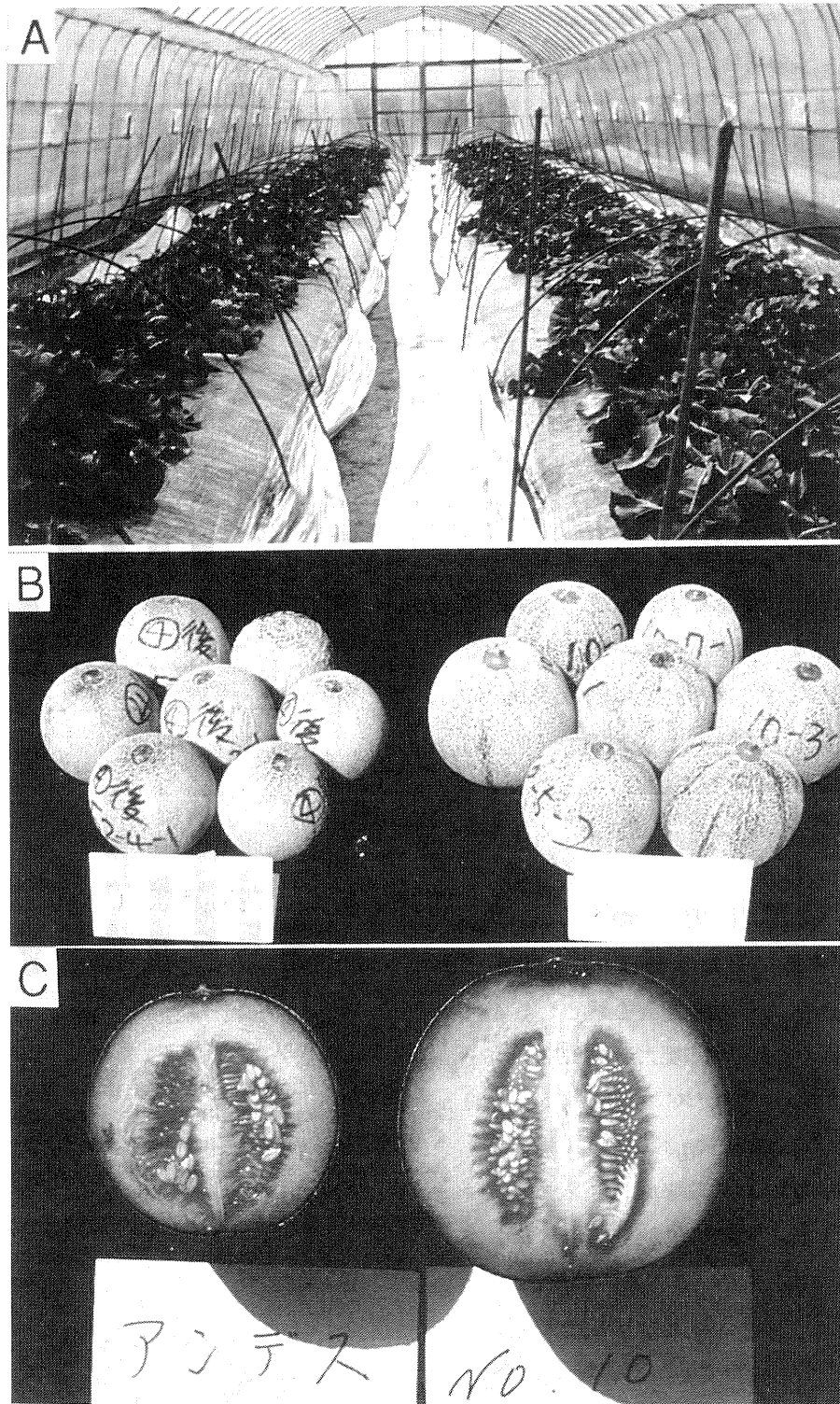


Fig.34. Melon plants with fruit-thickening growth at low temperature, which are selected from progenies of plants regenerated through tissue culture. A : plant grown in the green house, B : harvested fruits (left, original line ; right, selected line), C : longitudinal section of the fruits (left, original line ; right, selected line).

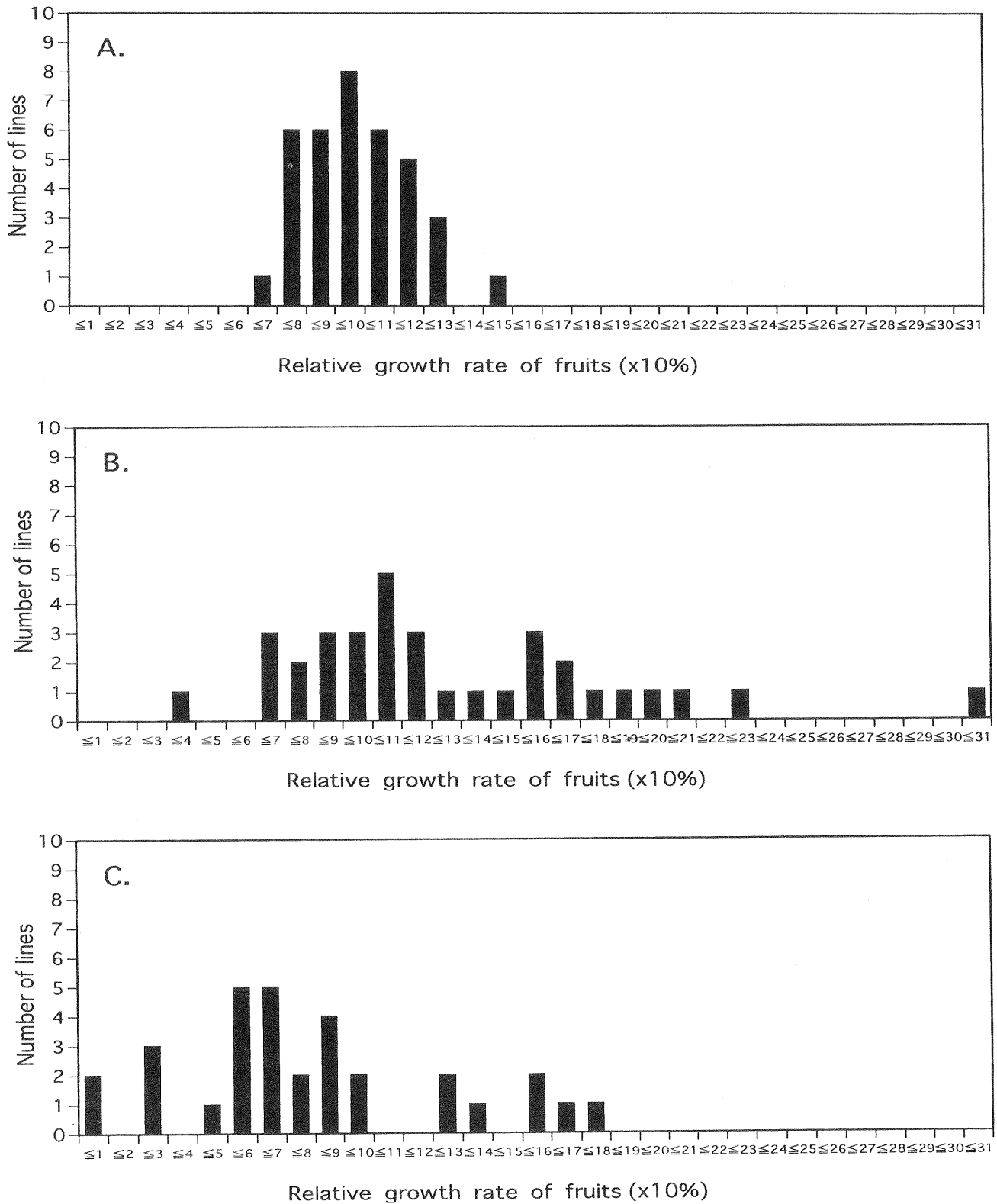


Fig.35. Relative growth rate of fruits in lines with a low temperature-germinability. The growth rate are represented as a 10-fold value relative to that in cv. 'Andes'. The total of 35, 34 and 31 lines used in A, B and C are selected from progenies of clonal plants regenerated through tissue culture. (A) : at early growth stage on 22 April, (B) : at middle stage on 10 May, (C) : at late stage on 24 May.

低温発芽率と着果日から4月22日までの果実の初期肥大量、5月10日までの中期肥大量および5月22日までの終期肥大量については統計的に有意な相関は認められなかった (Fig. 38 - A, B, C)。また、低温発芽率と着果日から4月22日までの果実の初期肥大速度、4月22日から5月10日までの中期肥大速度および5月10日から5月24日までの終期肥大速度についても統計的に有意な相関は認められなかった (Fig. 39 - A, B, C)。

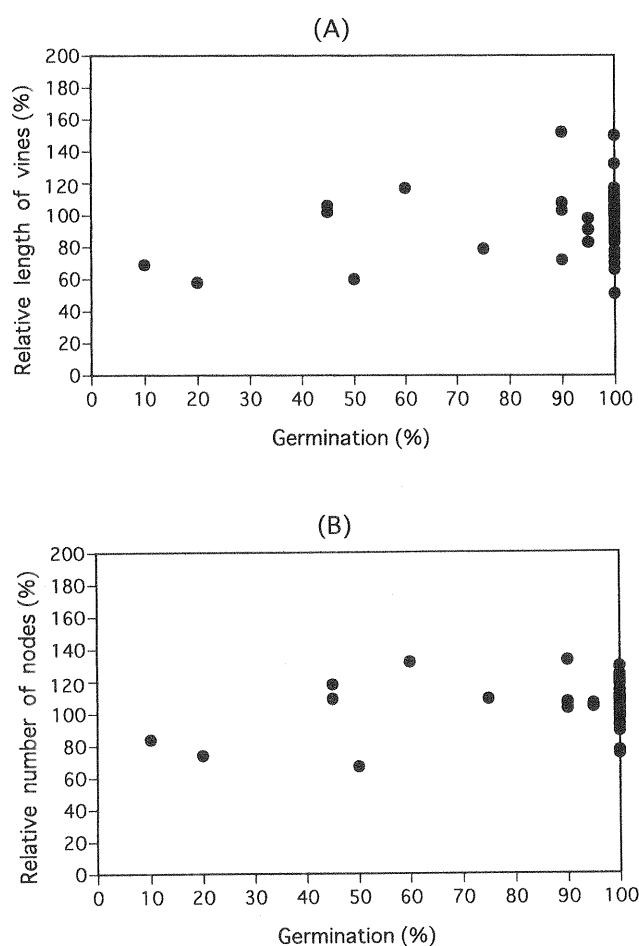


Fig.36. Relationship between the germination rates and the relative length of vines (A) and node numbers (B) in lines with a low temperature-germinability. The germination treatments are carried out at 15 °C for 5 days and then at room temperature for one day. The total of 47 lines used in the experiment are selected from progenies of clonal plants regenerated through tissue culture. Measurements are carried out on 10 February, 14 days of planting.

考察

本研究では、メロンの果実肥大性という最終的な生育段階における特性について、種子の低温発芽性という最も早い生育段階の形質を指標として選抜しようとした。植物を栽培したときの生育様相はその植物自身のもつ遺伝的要因と環境要因により決定される。生育初期の特性には遺伝的要因の果たす役割が大きいが、生育段階が進行するに従って環境要因の影響が大きくなる。またトマト (Vallejos and Tanksley 1983)

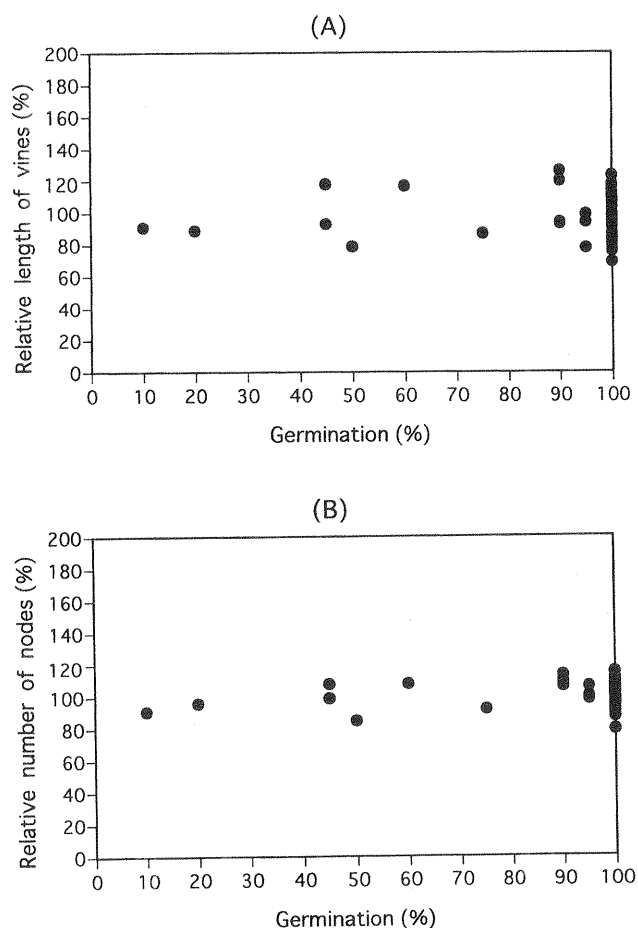


Fig.37. Relationship between the germination rates and the relative length of vines (A) and node numbers (B) in lines with a low temperature-germinability. The germination treatments are carried out at 15°C for 5 days and then at room temperature for one day. The total of 47 lines used in the experiment are selected from progenies of clonal plants regenerated through tissue culture. Measurements are carried out on 3 March, 35 days of planting.

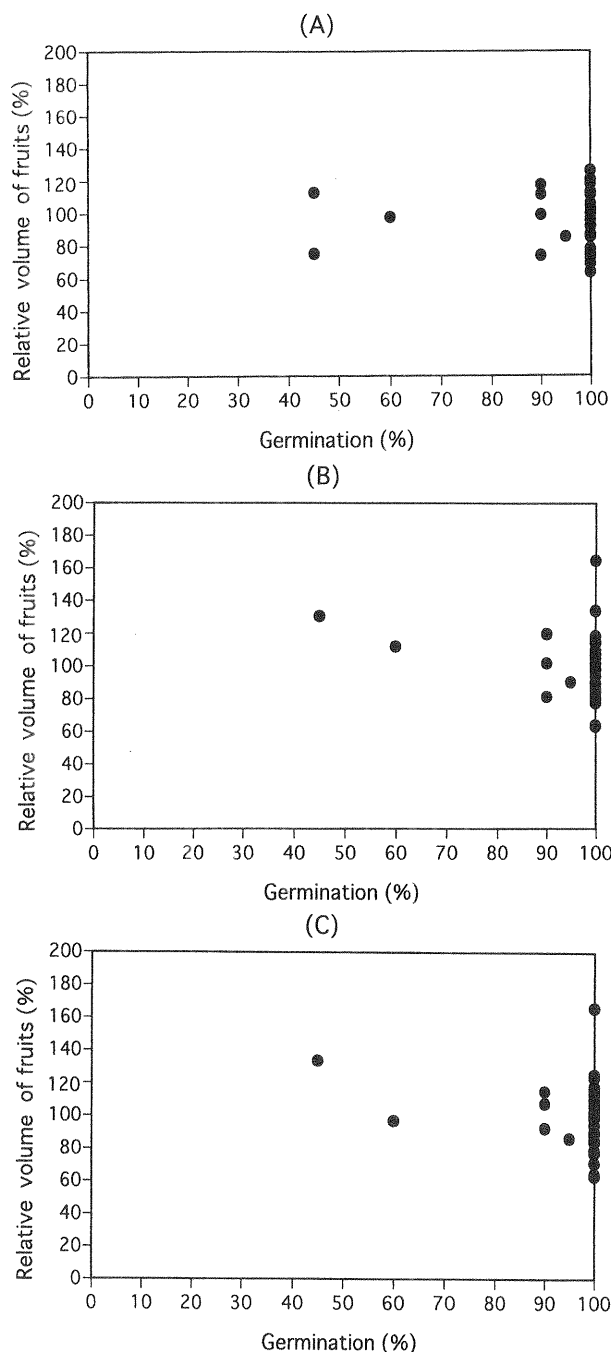


Fig.38. Relationship between the germination rates and the relative volume of fruits in lines with a low temperature-germinability. The germination treatments are carried out at 15 °C for 5 days and then at room temperature for one day. The total of 35, 34 and 31 lines used in A, B and C are selected from progenies of clonal plants regenerated through tissue culture. (A) : at early growth stage on 22 April, (B) : at middle stage on 10 May, (C) : at late stage on 24 May.

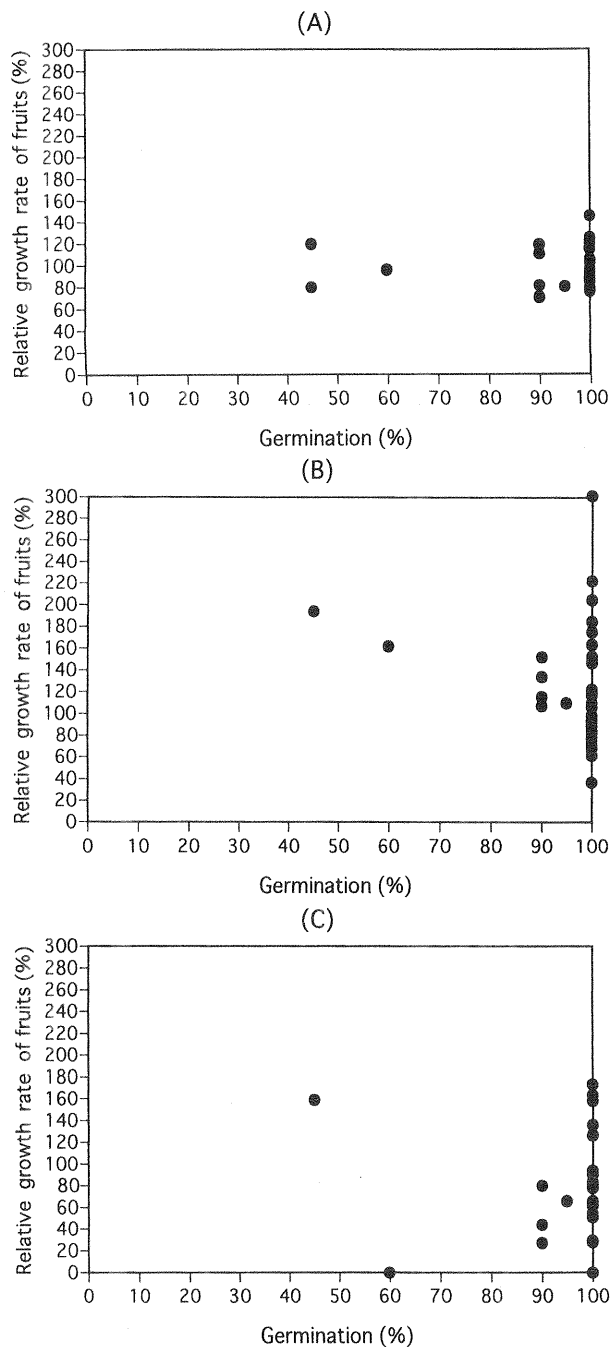


Fig.39. Relationship between the germination rates and the relative growth rate of fruits in lines with a low temperature-germinability. The germination treatments are carried out at 15 °C for 5 days and then at room temperature for one day. The total of 35, 34 and 31 lines used in A, B and C are selected from progenies of clonal plants regenerated through tissue culture. (A) : at early growth stage on 22 April, (B) : at middle stage on 10 May, (C) : at late stage on 24 May.

などで推定されているとおり、低温生育性は複数の遺伝子により支配される形質である。従って、発芽能力により果実肥大という生育の最終段階を予想することは困難であると考えられる。

メロン品種アンデスにおいて不定芽形成または不定胚形成培養系による再生植物の後代から低温発芽性により47系統を選抜し、低温条件下で栽培したところ、10系統が着果不良(着果率50%未満)となった。それらの系統は両性花の発育が悪く、また発育した少数の両性花も受粉したにも関わらず結実しなかった。着果が良好(着果率50%以上)であった系統の中にも裂果の多い(果実数の50%以上)系統が6系統含まれていた(Fig.32-C)。従って、これらの16系統では果実の最終的な収穫・調査ができなかった。果実の収穫調査ができた31系統のうちの48%に相当する15系統が、対照区の‘アンデス’よりも低温下での果実肥大性に優れており(Fig.33-C)、この系統数は圃場段階の最終選抜に用いた低温発芽性の良好な47系統のうちの32%に相当した。本章第1節における果実低温肥大性の選抜法を開発するとき予測されたとおり、本実験においても低温発芽性のみによって低温下での果実肥大性に優れた系統を確実に選抜することはできなかった。低温発芽性と選抜系統の生育または果実の肥大性との間にも有意な相関は認められなかった(Fig.36-39)。しかし、圃場段階の最終選抜の結果、種子の低温発芽性により選抜した系統の32%が果実肥大性に優れており、低温発芽性により選抜した系統には低温下での果実肥大性の良好な系統が高い確率で含まれていた。従って、低温下での果実肥大性に優れた系統を選抜する場合、種子の低温発芽性は一次選抜の指標としては有効であると考えられる。

低温発芽性により選抜した系統の中で‘アンデス’(対照)よりも着果日の早い系統は用いた系統の15%に相当する7系統であった。また、最終的には‘アンデス’よりも果実の大きい系統が32%含まれていた。時期別に果実の肥大速度を比較すると、初期、中期および終期において肥大速度が‘アンデス’

よりも大きい系統は、それぞれ43%、65%および23%であった(Fig. 35)。特に、中期の肥大速度の大きな系統が多かった。従って、着果日が‘アンデス’より早い系統が特に多くなかったにも関わらず、最終的に果実肥大の良好な系統が多く含まれていたのは、果実の中期肥大の良好な系統が多く含まれていたためと推定された。メロンの果実肥大速度は、通常は交配後30日程度で最大に達し、その後は低下することが知られている(野中・戸田・杉山1972)。本実験では、交配日は3月18日~28日であり(Fig. 28)、初期の肥大速度を測定した4月22日には最大肥大速度に達しているはずである。選抜した系統の中には、その後も肥大速度を増大した系統が多数含まれていた。従って、低温発芽性により選抜した系統は、肥大期間が長いまたは特に中期の肥大速度が大きな系統であったと考えられる。

本実験では対照とした‘アンデス’の栽培方法を基準として栽培したが、用いた低温発芽性の優れた47系統のうち10系統では着果率が低く、果実肥大性について十分な検討ができなかった。これらの10系統は初期から生育(栄養生長)が旺盛でその後に生殖生長が劣り、両性花の着生が不良となって、結果として栄養生長過度の状態(草ぼけ)になった。このことは、メロンの両性花は、環境要因としては低温や短日により分化が促進されること(神谷・田村1962)および内的要因としてはジベレリンなどの植物ホルモンの増大により分化が促進されること(Hemphillら1972)と関連があるものと考えられる。本試験では通常管理よりも低温下で管理を行っているため、外的条件としては、両性花の分化に適した条件と考えられるが、栄養生長が旺盛となり、“草ぼけ”し、両性花が着生しない場合があった。選抜した系統の生育が‘アンデス’程度または‘アンデス’より少し良い程度であれば、“草ぼけ”により花芽分化が不良となる現象は発生しないはずである。従って、本実験で草ボケした10系統は低温下での栄養生長が極めて良好であり、そのために両性花の着生が不良となった可能性がある。これらの系統が低温伸長性の良好な系統であったとすれば、

低温発芽性によりさらに効率的に低温伸長性に優れた系統が選抜できていたことになる。低温下での生育が良好であれば、今回の実験と異なる2本仕立て4果着けや3本仕立ての6果着けなど、株にとって負荷の多い仕立て方をすれば”草ばけ”せずに花芽分化が可能になると考えられる。これらの点については今後詳細に検討する必要がある。

本研究で実施した半促成栽培による栽培試験で両性花の着生の不良であった10系統のうちのNO.32では、8株定植したにもかかわらず、全く両性花が着生しなかったが、抑制栽培を行うと両性花が着生し採種が十分に可能であった（未発表）。今回の半促成栽培の作型では、抑制栽培と比べて、日照量、日長、温度、一日の変温幅などいろいろな環境要因が異なり、これらが両性花の分化に関与したと考えられるので今後検討したい。また、この変異系統を利用することによりメロンの花芽分化機構の生理的な解明が可能になると思われる。

第Ⅲ章の‘アンデス’の不定胚形成および不定芽形成培養系での二倍体出現率（70%）や再生植物体

の後代種子の低温発芽率（一次選抜段階：0.7%、二次選抜段階：2.7%）および最終段階での果実低温肥大性をもつ系統の割合（32%）を考慮し、各系統を自殖したときの株当たりの採種数を平均200粒と仮定した場合、Fig.40のような効率で低温発芽性に優れた系統の選抜が可能であると推定される。即ち、不定芽形成または不定胚形成培養系を利用して100株の再生植物体を得ると、そのうち二倍体は70個体となり、これらから14,000粒の種子（R₁）の採取が可能である。これらの種子を一次選抜にかけると98の発芽力のある種子および植物体（R₁）が得られ、これらから19,600粒の後代種子（R₂）が採取できる。更に、これらを二次選抜にかけると529粒の発芽種子が得られ、最終の圃場での選抜により、このうちから169系統が果実低温肥大性の高い優れた系統として選抜されることが予想される。

本研究で選抜した低温肥大性に優れた系統は、既に選抜過程で自殖を3回行っており、選抜形質についてはかなり固定しているものと考えられる。しかし、トマト（Vallejos and Tanksley 1983）で推定さ

<i>Regenerated plant</i>	: 100 plants
<i>through thissue culture</i>	
<i>Diploid plant</i>	: 100 plants x 70%= 70 plants
<i>No. of seeds obtained</i>	: 70 plants x 200 seeds/plants=14,000 seeds
<i>First selection</i>	: 14,000 seeds x 0.7%= 98 plants
<i>No. of seeds obained</i>	: 98 plants x 200 seeds/plants=19,600 seeds
<i>Second selection</i>	: 19,600 seeds x 2.7%=529 plants
<i>Field selection</i>	: 529 plants x 32%=169 plants

Fig.40. Schematic representation of selection for low temperature germinating variants in melon.

れているように、本研究で選抜したメロンの低温肥大性には複数の遺伝子により制御されていることが予想されるため低温肥大性の不良な系統との交配実験を行い、関与する遺伝子数の推定を行う必要がある。また、今後育種素材として利用するために、その他の有用形質についても固定化を図って行く予定である。

VII 総 合 考 察

メロンの細胞・組織培養による植物体再生は1980年代から精力的に研究され、不定芽形成培養系(Morenoら1985; Bouabdallah and Branchard 1986; 末松ら1986; Kathalら1988; Dirks and Buggenum 1989)、不定胚形成培養系(Youngら1983; Oridate and Oosawa 1986; 小川ら1990; Kageyamaら1990、1991)、苗条原基形成培養系(永井ら1989)、プロトプラスト培養系(山中ら1990; 豊田ら1991; 野村ら1993)、腋芽伸長培養系(Ohkiら1991)などいろいろな方法で植物体再生が可能となっている。これらの培養系はメロンの品種改良や種苗の大量増殖などへの利用が期待されている。しかし、その前提となる再生植物体の体細胞突然変異に関する研究は全く行われていない。本研究では、メロンの細胞・組織培養によって生じる倍数性を初めとする各種の変異体の出現を検討し、その実用的な有効性を検証したものである。

本研究では、次のような点が明らかにされている。

1) 現在までに報告されているメロンの各種培養系(不定芽形成、不定胚形成、苗条原基形成、腋芽伸長培養系)の中では不定芽形成および不定胚形成培養系が体細胞突然変異の出現頻度の高い培養系であり、一方、苗条原基形成培養系では体細胞突然変異出現が比較的少なく、腋芽伸長培養系が最も体細胞突然変異の出現しにくい培養系であると考えられる。

2) 不定芽形成および不定胚形成培養系では培養の進行に伴い、培養細胞の倍数性や異数性に関する変異が急速に拡大し、半数性から九倍性以上の高次倍数性及びそれらの異数性など多様な細胞が出現した。しかし、再分化の段階ではこれら多様な細胞の中で二倍性または四倍性細胞から選択的に植物体が再生するものと推測された。

3) メロンでは、組織培養により作出した四倍体も、コルヒチン処理法により作出または自然突然変異体として発見されている四倍体メロンと質的に同じであり、組織培養法、特に、不定芽形成培養系および不定胚形成培養系はメロンの新しい倍数体作出技術になるものと考えられる。

4) 各種培養系により作出できなかったメロンの三倍体や異数体は、組織培養により作出した四倍体と二倍体の交雑ならびにF₁種子の胚培養を利用する方法により作出できた。

5) 体細胞突然変異出現頻度の高かった不定芽形成または不定胚形成培養系を利用して、低温発芽性や果実低温肥大性に優れた有用系統の選抜が可能であった。

また、本研究は以下の点から意義深いものと考えられる。

1) メロンの各種培養系における体細胞突然変異出現の様相がわかり、それらの培養系を細胞選抜、細胞融合、外来遺伝子導入、大量増殖などいろいろな場面に利用するための基礎的な知見とすることができた。

2) 腋芽伸長培養系以外のメロンの培養系では、四倍体が普遍的に出現していることが判明し、その出現機構についても明らかとなった。従って、四倍体の出現が少ない培養系は変異出現頻度の低い培養系と考えられ、四倍体の出現頻度が安定した培養系を改良する場合の1つの指標になりうると考えられる。

3) 不定芽形成および不定胚形成培養法がメロンの新しい倍数体作出法(但し、四倍体の作出まで)になりうると考えられる。特に半数体を倍加するための効果的な方法になると考えられる。コルヒチンによる倍加では、半数体育種のように1個体しか対象個体がない場合、確実に倍加するのは困難である。しかし、組織培養によるならば、1個体から多くの外植片を得ることが可能で、確実に倍加できると考えられる。

4) 本研究が行われるまでメロンでは異数体の作出が報告されていなかった。しかし、胚培養技術を併用することにより異数体が作出できた。これによりメロンでも異

数体を遺伝育種研究へ用いる道が開けたものと考えられる。

5) 不定芽形成および不定胚形成培養系に出現する体細胞突然変異を利用して有用な変異体が選抜できることを実証することができた。従って、体細胞突然変異がメロンにおける遺伝変異拡大方法の一つとして有効であると考えられる。

6) 以上の事実は各種培養系を利用してメロンの生理学的、遺伝学および育種学的研究などに取り組んでいる研究者または将来取り組もうとしている研究者ならびにそれらの培養系を実用的場面に利用しようとしている技術者に対して極めて重要な知見を提起した。

本研究により、メロンの組織培養系における体細胞突然変異出現機構の一部が明らかにされたが、今後以下の研究を進めていく必要があると考えられる。

1) メロンの細胞・組織培養では、他の植物に比べて、倍数性変異、特に四倍体が再生植物体に多数出現した。メロンにおいて組織培養技術を品種改良、種苗の大量増殖、生理的機能の解明などの研究に利用するに当たって、これら倍数性変異を制御することも必要と考えられる。組織培養過程の各段階における染色体観察から、これらの倍数性変異が培養の極めて早い時期に生じていることが明らかとなった。従って、この過程に適切な改良を加えると倍数性変異は減少が可能になると考えられる。

2) 不定胚形成または不定芽形成培養系がメロンにおける新しい染色体倍加法となることが明らかになった。メロンの多くの系統では、単偽結果した果実の胚珠培養により、効率的な半数体の作出が可能となっており (Katoh ら 1993)、これらの半数体をコルヒチン処理により倍加を試みているが、達成されていない (私信)。これらの半数体作出技術と、本研究において見出された新たな染色体倍加法とを組み合わせることにより、効率的なメロンの形質固定技術が確立されるものと推測される。

3) 本研究では、メロンの不定芽形成および不定胚形成培養系を利用して変異体を作出できることが明らかとなり、実際に低温発芽性や果実の低温肥大性の優れた変異系統を選抜できたので、今後、耐病性、品質、生態的特性などに関する有用変異体の選抜が期待される。シロイ

ヌナズナで盛んに使用されているように (志村 1992)、突然変異体は生物機能の解明に重要な役割を果たしているので、本研究で選抜された両性花分化に関する変異体についても、今後そのような解析を進めて行く予定である。

4) 本研究により低温発芽性や果実の低温肥大性に優れた変異系統が選抜された。低温発芽性は、作物栽培において極めて重要な形質であり、今後、他の作物の低温発芽性の改良への応用を可能にすることも期待できる。

5) 本研究における低温発芽性や果実低温肥大性には複数の遺伝子が関与していることが予想される。即ち、低温発芽性と果実低温肥大性とは選抜系統の約半数で一致していたが、残りの系統では一致していなかった。今後これらの形質を育種に活用して行くには、両形質に關与する遺伝子数の推定、優劣性の推定および両遺伝子の連鎖関係や作用効果についての詳しい解析を進めて行く必要がある。

6) 既に低温発芽性や果実低温肥大性の特に良好な系統については、実用的な形質がほぼ固定していると考えられるので、果実低温肥大性に優れた実用品種の育種素材とし活用して行く予定である。

VIII 摘 要

メロンの細胞・組織培養では、不定芽形成、不定胚形成、苗条原基形成、プロトプラストおよび腋芽伸長などの培養系により植物体再生が可能である。これらの培養系をメロンの育種に利用するうえで、各種培養系における体細胞突然変異の出現頻度とスペクトラムについて明らかにしておくことが極めて重要である。

そこでメロンの組織培養によって出現する体細胞突然変異とその利用について検討するため、1) 倍数性変異についてメロンの細胞・組織培養系 (不定胚形成培養系、不定芽形成培養系、苗条原基形成培養系、腋芽伸長培養系) における体細胞突然変異の出現頻度を比較し、2) 倍数性変異の出現機構、3) 高頻度に出現する四倍体の利用、4) 体細胞突然変異による変異性の拡大を利用した低温発育性メロンの選抜などについて検討し、メロンの細胞・組織培養による再生植物体に生じる体細胞突然

変異を育種の利用に役立てるとともに、その実用的な価値について検証した。

1. 本研究で主に材料として用いたメロン品種はプリンスメロン、アンデスおよびアムスであり、不定芽形成、不定胚形成、苗条原基形成および腋芽伸長培養系における反応と植物体再生過程について検討した。

(1) 不定芽形成培養系として Dirks and Buggenum (1989) の方法を用いた。材料とした3品種で不定芽の誘導および植物体再生が可能であった。不定芽分化過程の顕微鏡観察からカルス経由の分化であることを明らかにした。

(2) 不定胚形成培養系として Oridate and Oosawa (1986) 方法を改変した方法を用いた。材料とした3品種で不定胚誘導および植物体再生が可能であった。不定胚分化過程の顕微鏡観察からカルス経由の分化であると判断された。

(3) 苗条原基形成培養系として永井ら (1989) の方法を用いて ‘プリンスメロン’ の苗条原基の誘導過程と植物体再生過程を観察した。その結果、苗条原基形成培養系は、茎頂からの直接的な植物体再生方法であることが明らかとなった。

(4) ‘プリンスメロン’の腋芽伸長培養系による植物体再生過程を観察した結果、定芽として存在した腋芽を発育させる直接的な植物体再生法であることが確認された。

2. メロンの体細胞突然変異の指標の検索と、特に各種培養系における倍数性変異の出現頻度について検討した。

(1) 品種グリーンパールの不定胚由来の再生植物体を栽培し、形態的変異について調査した結果、四倍体が高頻度に出現しており、この頻度は培養系における他の突然変異の出現頻度を推定する指標の一つとして有効であると考えられる。

(2) ‘プリンスメロン’、‘アンデス’および‘アムス’を用い不定芽形成、不定胚形成、苗条原基形成および腋芽伸長培養系による再生植物体の倍数性変異(四倍体)の出現頻度について調査した。四倍体は用いた全品種で検出された。その頻度は、不定胚または不定芽由来の植

物体で高く、それぞれ31%、30%であり、苗条原基由来の植物体では4%であった。腋芽伸長培養系による再生植物体には四倍体が確認できなかった。メロンの各種培養系の中の不定芽形成および不定胚形成培養系では、再生植物体に四倍体が高頻度に出現することから、倍数性以外の体細胞突然変異の発生も多いであろうと考えられる。

3. 二倍体メロンを外植片とした場合の不定芽形成および不定胚形成培養系の培養初期から植物体再生までの過程における培養細胞の染色体数変化について調べるとともに、四倍体メロンを外植片とした場合の不定芽形成および不定胚形成培養系における再生植物体の染色体数を観察し、メロンの組織培養に伴う倍数性変異の出現機構について考察した。

(1) 不定芽形成培養系により誘導した ‘プリンスメロン’ と ‘アンデス’ のカルス細胞および再生植物体の根端細胞における染色体数の観察を行った。その結果、メロンの不定芽形成培養系では培養開始1週間後から2週間後という早い時期に培養細胞の倍数性変異が急速に拡大すること、植物体再生過程で二倍性および四倍性細胞から選択的に植物体が再生していることが明らかになった。

(2) 不定胚形成培養系により誘導した ‘プリンスメロン’ と ‘サンデー秋’ のカルス細胞、不定胚および再生植物体における染色体数の観察を行った。その結果、メロンの不定胚形成培養系では、培養の進行に伴い細胞の倍数化が急速に進行し、このような倍数性細胞の中の二倍性、四倍性および八倍性細胞から選択的に不定胚が形成され、更に、その中の二倍性および四倍性不定胚から選択的に植物体が再生してくることが明らかになった。

(3) 不定芽形成および不定胚形成培養系によって再生した植物体の染色体数観察を行った結果、再生植物体の全てが四倍体であった。従って、メロンでは五倍性以上の高次倍数性細胞からの植物体再生は困難であると推測された。

(4) 以上のことから、メロンの組織培養では以下の様な経過で四倍体が高頻度に出現するものと考えられる。即

ち、1) 組織培養の進行に伴い、培養細胞の倍数性変異が急速に拡大する。2) 不定芽および不定胚の分化過程において、これらの多様な細胞中の二倍性、四倍性および八倍性細胞から選択的に不定芽および不定胚が形成され、この段階で培養細胞中に観察された異数性や他の倍数性細胞は排除される。3) 更に植物体再生の段階において二倍性および四倍性の不定芽および不定胚から植物体が再生する。その際、倍数性の低い不定芽や不定胚ほど植物体として再生しやすく、五倍性以上の細胞または異数性細胞からの植物体再生は極めて困難である。4) その結果、メロンの再生植物体には二倍体の他に四倍体が高頻度に出現する。

4. メロンの細胞・組織培養における再生植物体は、二倍体、四倍体および二倍性と四倍性細胞をキメラにもつ混数体であった。そこで組織培養によって作出した四倍体を利用して三倍体や異数体の作出を試みた。

(1) 組織培養により作出した四倍体を利用してまず三倍体の作出を試みた。二倍体×四倍体の交雑では、子葉の発達が不十分な発育不全胚を含む種子が得られ、これらはMS培地に無菌播種すると正常な三倍体個体になった。果実当たりの三倍体出現数は、6.8～17.2個体で、従来の交配のみによる三倍体作出法に比べて極めて効率的な方法であった。これらのことから、組織培養により高頻度に出現した四倍体メロンが、自然突然変異やコルヒチン処理により人工的に作出した四倍体と同様に、三倍体メロンの作出に使用できること、三倍体メロンはかかる交雑手法と胚培養を組み合わせることにより効率よく作出できることが明らかになった。

(2) 更に、作出した三倍体メロンを利用して異数体メロンの作出を試みた。三倍体×二倍体の交配より得られた未成熟種子と思われる種子をMS培地に無菌播種すると、やがて種皮が割れて内部から胚状の組織が現れ、この組織をMS培地上で継代培養すると一部はシュートを形成した。これらの中の一部のシュートは発根し小植物体となった。根端細胞の染色体数を観察した結果、発根した5個体中4個体が $2n=27, 35, 45$ および46本の異数体であった。

5. 不定芽形成および不定胚形成培養系を利用して、果実肥大性に優れた変異個体の選抜を試みた。そのために、1) 低温発育性変異個体の選抜法の開発、2) その選抜法を利用した培養系よりの選抜、3) 選抜系統の特性調査を行った。

(1) メロンは単位面積当たりの栽培株数が少なく、また栽培方法も煩雑であり、低温発育性に優れた個体を選抜するための効率的な選抜方法が必要であることから、低温発育性を指標とした選抜方法について検討した。‘アンデス’の自殖種子を、17℃で発芽したグループ（以降CTグループと呼ぶ）と発芽しないグループ（以降CSグループと呼ぶ）に分け、低温管理下で栽培した。低温発芽性と草丈および節数の増加量との間に有意な関係は認められなかった。一方、低温発芽性と果実重量との間には、一定の傾向が認められた。低温発芽性と果実肥大性を因子として特性を分類すると、低温発芽性と果実肥大性が一致する系統群（タイプ1）、低温発芽性を有するが果実肥大性のない系統群（タイプ2）、低温発芽性がなく果実肥大性のある系統群（タイプ3）および低温発芽性と果実肥大性のともにない系統群（タイプ4）に分類された。CTグループの果実重量の分布には、1,100gと600gの2つのピークが認められ、前者の個体群はタイプ1、後者の個体群はタイプ2と考えられる。また、CSグループは果実重量分布で700gに1つのピークが認められたので、タイプ4と考えられる。タイプ3に相当する個体群は本実験では認められなかった。‘アンデス’の自殖種子よりの母集団の中では17℃で発芽する個体が20%、発芽しない個体が80%であったので、低温発芽性を指標として母集団の中から果実肥大性が不良な個体を多量に排除することが可能であると考えられる。実際には、メロン栽培品種は全く発芽しないが、低温伸長性台木として用いるカボチャがわずかに発芽するような15℃、5日間の処理条件下で発芽した個体を選抜するのが適切と考えられる。

(2) 不定芽形成および不定胚形成培養系より再生した植物体の後代から低温発育性に優れた個体の選抜を行った。‘アンデス’および‘アムス’の再生植物体の次代種子28,105粒に15℃で5日間の発芽処理を行った結果、0.5

%の種子が発芽した(一次選抜)。更に、これらの次代種子6,198粒に14℃で7日間の発芽処理を行った結果、2.5%が発芽した(二次選抜)。「アンデス」の再生植物体の後代から二次選抜した47系統の次代種子を採取し、15℃で5日間処理したところ、37系統が「アンデス」より高い発芽率を示した。更に、1日室温で放置したところ、その他の系統も急速に発芽し、最終的には45系統が「アンデス」より高い発芽率を示した。また、低温下における選抜系統の発芽率は、選抜を繰り返すことによって向上したが、系統により発芽率に10%から100%までの変異幅があったことから低温発芽形質は、複数の遺伝子に支配される遺伝形質であると推定された。

(3) 「アンデス」の不定芽形成または不定胚形成培養系より再生した植物の後代から、低温発芽性により47系統を選抜し、これを低温条件下で栽培した結果、着果が不良な系統と裂果の多い系統が総計で16系統含まれており、最終的には31系統で果実の収穫調査が可能であった。その結果、調査できた31系統の48%に相当する15系統が果実肥大性において「アンデス」より優れており、低温発芽性によって選抜した系統には、低温下での果実肥大も良好な系統がかなり高い確率で含まれていた。果実の発育時期別の肥大速度を品種・系統間で比較すると、初期、中期および終期の肥大速度が「アンデス」より大きい系統は、初期で43%、中期で65%および終期で19%となり、特に、本研究における選抜では、中期の肥大速度の大きな系統が選抜されたと考えられる。

6. 細胞・組織培養によって再生したメロン植物体に生じる体細胞突然変異の出現の様相を明らかにし、その実用的な有効性を検証した結果、以下の点が明らかになった。

(1) 不定芽形成、不定胚形成、苗条原基形成、腋芽伸長培養系の中で、不定芽形成および不定胚形成培養系で四倍体の出現より明らかな如く体細胞突然変異が多く出現し、苗条原基形成培養系では比較的少なく、腋芽伸長培養系では最も出現しにくいと考えられる。

(2) 不定芽形成および不定胚形成培養系では、培養の進

行に伴い培養細胞の倍数性や異数性の変異が急速に拡大したが、再分化の段階では二倍性または四倍性細胞から選択的に植物体が再生した。

(3) 組織培養により作出した四倍体メロンは他の方法で作出した四倍体と質的に同様に、不定芽形成および不定胚形成培養系は新しい倍数体作出技術になることが確認された。

(4) 組織培養のみでは作出できなかった三倍体や異数体は、作出した四倍体を用いる交雑と胚培養を組み合わせることで作出できた。

(5) 体細胞突然変異の出現頻度が高いとみられる培養系を利用することにより、低温発芽性や果実低温肥大性に優れた系統の選抜が可能であった。

本研究の成果は以上のように要約されるが、更に次のような示唆を与えるとともに課題を提起している。

1) メロンでは、四倍体が他の植物より多く出現するので、それらをいろいろな場面で利用するため、培養方法の改良などにより倍数性変異を制御することが必要である。2) 不定胚形成または不定芽形成培養系が新しい染色体倍加法となることが明らかになったので、半数体作出技術とこの技術を組み合わせて形質を早期に固定せしめる方法の開発が期待される。3) 不定芽形成および不定胚形成培養系を利用して低温発芽性や低温果実肥大性に優れた変異体を選抜できた。今後は耐病性、品質、生態的特性などに関しても有用変異体の選抜が期待される。4) 低温発芽性は、作物栽培において極めて重要な形質であり、選抜系統を生理学的に解析することにより、低温発芽性の出現機作が明らかになる可能性がある。5) 低温発芽性や果実低温肥大性のような形質を育種に利用して行くには、両形質に関与する遺伝子の固定、その数の推定、優劣および両遺伝子の連鎖などについての解析を進めて行く必要がある。

IX 謝 辞

本論文のまとめに際しては北海道大学農学部教授原田隆博士、同農学部教授木下俊郎博士、同農学部教授喜久田嘉郎博士からは懇篤なるご指導と綿密なご校閲を賜った。また、北海道大学名誉教授八鍬利郎博士には懇篤な

るご指導を賜った。英文要旨については、John Innes Centre の Nicholas P Harberd 博士に綿密な御校閲を賜った。ここに謹んで深甚なる感謝の意を表する。

本研究を行うにあたり、茨城県農業総合センター生物工学研究所長大澤勝次博士には本研究の端緒を与えられ終始ご指導と激励を賜り、本論文をとりまとめるにあたり、有益なるご教示をいただいた。

元茨城県園芸試験場長小森昇氏、同根本弘氏、同小沼寛氏、同資源開発部長故内田和馬博士、茨城県農業総合センター園芸研究所長故石塚由之氏、茨城県農業総合センター生物工学研究所野菜育種研究室長窪田満氏、同室雨ヶ谷洋氏には研究上種々のご配慮と激励を賜った。また茨城県農業総合センター生物工学研究所野菜育種研究室西宮聡氏、同菊田功氏、同果樹花き育種研究室霞正一氏、同園芸研究所野菜研究室鈴木雅人氏、北海道大学大学院吉岡啓子氏ならびに筑波大学大学院佐々木和生氏には研究推進上のご援助をいただいた。その他、農業総合センター生物工学研究所および園芸研究所の各位にも多大のご協力をいただいた。さらに、試験圃場管理は小島和明氏、田崎孝氏のご援助によるところが大きかった。これら関係各位には心から感謝の意を表する。

X 引用文献

- Adkins, S.W., T. Shiraishi, J.A. McComb, S. Ratanapol, T. Kupkanchanakul, L.J. Armstrong and A.L. Schultz, 1990. Somaclonal variation in rice-submergence tolerance and other agronomic characters. *Physiol. Plant.* 80:647-654.
- Ahloowalia, B.S. 1982. Aneuploids of perennial (*Lolium perenne*). *Euphytica* 31:103-111.
- 有山昌宏・吉岡啓子・江面浩・大澤勝次 1992. メロンのプロトクローンのハウス栽培における生育特性と形質発現. 育雑 42 (別2) : 136-137.
- Batra, S. 1952. Induced tetraploidy in muskmelon. *J. Hered.*, 43:141-148.
- Behnke, M. 1980. General resistance to late blight of *Solanum tuberosum* plants regenerated from callus resistant to culture filtrates of *Phytophthora infestans*. *Theor. Appl. Genet.* 56:151-152.
- Bouabdallah, L. and M. Branchard, 1986. Regeneration of plants from callus cultures of *Cucumis melo* L. *Z. Pflanzenzuchtg.*, 96:82-85.
- Bulk, R.W., J. Jansen, W.H. Lindhout and H.J.M. Löffler, 1991. Screening of tomato somaclones for resistance to bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*). *Plant Breed.* 107:190-196.
- Burg, H.C.J., K.S. Ramulu, G.M.M. Bredemeijer, S. Roest, S.P. Dijkhui, J.J. Hoogen and A. Houwing, 1989. Patterns of phenotypic and tuberprotein variation in plants derived from protoplasts of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Bintje). *Plant Sci.* 64:113-124.
- D'Amato, F. 1977. Cytogenetics of differentiation in tissue and cell cultures. In "Plant Cell, Tissue, and Organ Culture" Reinert, J. and Y. P.S. Bajaji (eds.), Springer-Verlag, New York, 343-357.
- Damiani, F., D. Mariotti, M. Pezzotti and S. Arcioni, 1985. Variation among plants regenerated from tissue culture of *Lotus corniculatus*. *Z. Pflanzenzucht.* 94:332-339.
- Dirks, R. and M. Buggenum, 1989. *In vitro* plant regeneration from leaf and cotyledon explants of *Cucumis melo* L. *Plant Cell Rep.*, 7:626-627.
- Edelstein, M., J. Kigel and H. Nerson, 1991. Relationships among germination emergence and seedling development of muskmelon at low temperature. *Sci.Hortic.* 47:51-58.
- Eizenga, G.C., 1989. Meiotic analysis of tall fescue somaclones. *Genome* 32:373-379.
- 江面浩・雨ヶ谷洋 1990. イチゴの葯カルス由来再生植物体の変異. 茨城園試研報 15:31-38.
- 江面浩・雨ヶ谷洋・吉岡啓子・大澤勝次 1992a. 不定胚培養系による四倍体メロンの効率的な作出. 育雑42:

- 137-144.
- Ezura, H., H. Amagai, K. Yoshioka and K. Oosawa, 1992b. Highly frequent appearance of tetraploidy in regenerated plants, a universal phenomenon, in tissue culture of melon (*Cucumis melo* L.). Plant Sci. 85:209-213.
- Fang, G. and R. Grumet, 1990. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and regeneration of muskmelon plants. Plant Cell Rep., 9:160-164.
- Feher, F., M.H. Tarczy, I. Bocsa and D. Dudits, 1989. Somaclonal chromosome variation in tetraploid alfalfa. Plant Sci. 60:91-100.
- Freytag, A.H., A.P. Rao-Arelli, S.C. Anand, J.A. Wrather and L.D. Owens, 1989. Somaclonal variation in soybean plants regenerated from tissue culture. Plant Cell Rep. 8:199-202.
- 藤下典之・柴田哲生 1990. メロンの低稔実組合せ2倍体(♀)×4倍体(♂)で形成される発育不全胚からの培養による植物誘導. 育雑40(別2):2-3.
- Gmitter, F.G., X.B. Ling, C.Y. Cai and J.W. Grosser, 1991. Colchicine-induced polypoidy in *Citrus* embryogenic cultures, somatic embryos, and regenerated plantlets. Plant Sci. 74:135-141.
- Hashim, Z.N., W.F. Cambell and J.G. Carman, 1990. Morphological analyses of spring wheat (CIM MYTcv. PCTY-10) somaclones. Plant Cell Tissu. Org. Cult.20:95-99.
- Hemphill, D.D., L.R. Baker and H.M. Sell, 1972. Different sex phenotypes of *Cucumis sativus* L. and *C. melo* L. and their endogenous gibberellin activity. Euphytica 21:285-291.
- Heath-Pagliuso, S. and L. Rappaport, 1990. Somaclonal variant UC-T3: the expression of *Fusarium* wilt resistance in progeny arrays of celery, *Apium graveolens* L. Theor. Appl. Genet. 80:390-394.
- Karp, A. and S.E. Maddock, 1984. Chromosome variation in wheat plants regenerated from cultured immature embryo. Theor. Appl. Genet. 67:249-255.
- Krikorian, A.D., S.A. O'Connor and M.S. Fitter, 1983. Chromosome Number Variation and Karyotype Stability in Cultures and Culture-derived Plants. In "Handbook of Plant Cell Culture" Evans D.A., W.R. Sharp, P.V. Ammirato and Y. Yamada (eds.), Macmillan, New York, 541-581.
- Kageyama, K., K. Yabe and S. Miyajima, 1990. Somatic embryogenesis and plant regeneration from stem, leaf and shoot apex of melon (*Cucumis melo* L.). Plant Tissue Cult. Lett. 7:193-198.
- Kageyama, K., K. Yabe and S. Miyajima, 1991. Somatic embryogenesis in suspension culture of mature seed of *Cucumis melo* L. Jpn. J. Breed., 41:273-278.
- 神谷圓一・田村茂, 1962. マスクメロンの育苗生理に関する試験. 静岡農試研報 7:32-44.
- Kanda, M., S. Kikuchi, F. Takaiwa and K. Oono, 1988. Regeneration of variant plants from rice (*Oryza sativa* L.) protoplasts derived from long term cultures. Jap. J. Genet. 63:127-136.
- Kathal, R., S.P. Bhatnagar and S.S. Bhojwani, 1988. Regeneration of plants from leaf explants of *Cucumis melo* cv. Pusa Sharbati. Plant Cell Rep. 7:449-451.
- Katoh, N., M. Hagimori and S. Iwai, 1993. Production of haploid plants of melon by pseudofertilized ovule culture. Plant Tiss. Cult. Lett. 10: 60-66.
- Kuehnle, A.R. and E.D. Earle, 1989. *In vitro* selection for methomyl resistance in CMS-T maize. Theor. Appl. Genet. 78:672-682.
- Kukreja, A.K. O.P. Dhawan, A.K. Mathur, P.S. Ahuja and S. Mandal, 1991. Screening and evaluation of agronomically useful somaclonal variations

- in Japanese mint (*Mentha arvensis*). Euphytica 53:183-191.
- Larkin, P.J. and W.R. Scowcroft, 1981. Somaclonal variation-a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor. Appl. Genet. 60:197-214.
- Maluf, W.R. and E.C. Tigchelaar, 1980. Responses associated with low temperature seed germinating ability in tomato. J. Am. Soc. Hort. Sci. 105:280-283.
- Mathur, A.K., P.S. Ahuja, B. Pandey, A.K. Kukreja and S. Mandal, 1988. Screening and evaluation of somaclonal variations for quantitative and qualitative traits in an aromatic grass, *Cymbopogon winterianus* Jowitt. Plant Breed. 101:321-334.
- 南川隆雄, 1984. 種子発芽の生化学. 化学と生物. 22:84-92.
- Mok, M.C., W.H. Gabelman and F. Skoog, 1976. Carotenoid synthesis in tissue culture of *Daucus carota*. J. Am. Soc. Hort. Sci. 101:442-449.
- Moreno, V., M. Garcia-Sogo, I. Granell, B. Gracia-Sogo and L.A. Roig, 1985. Plant regeneration from calli of melon (*Cucumis melo* L., cv. Amarillo oro'). Plant Cell Tiss. Org. Cult. 5:139-146.
- 村松幹夫 1987. 染色体と遺伝. "植物遺伝学 藪野友三郎・木下俊郎・村松幹夫・三上哲夫・福田一郎・坂本寧男 共著" 朝倉書店 69-129.
- Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15:473-479.
- 野中民雄・戸田敏彦・杉山芳郎, 1972. 海岸砂地地帯におけるネット型メロンの栽培に関する研究. 第2報 開花後日数と果実の品質および日持ちとの関係. 静岡農試研報 17:11-20.
- 永井輝行・野村幸雄・大澤勝次, 1989. メロンの苗条原基の誘導と植物体再生. 園学雑 58 (別1) : 208-209.
- Niedz, R.P., S.S. Smith, K.B. Dunbar, C.T. Stephens and H.H. Murakishi, 1989. Factors influencing shoot regeneration from cotyledonary explants of *Cucumis melo*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 18:313-319.
- 新田剛史・高畑義人・海妻拒彦, 1993. Brassica属小胞子からの不定胚発生における形態学的研究. 育雑 (別1) :55.
- 野村幸雄・古田秀雄・前田樹夫・真柄紘一, 1993. メロンのプロトプラストからの直接胚形成. 育雑 (別1) :15.
- Nugent, P.E. and D.T. Ray 1992. Spontaneous tetraploid melons. HortSci. 27:47-50.
- 小川理恵・景山幸二・矢部和則・桜井擁三・宮島成寿 1990. メロンの本葉、茎からの胚様体形成と植物体再生. 園学雑 59(別2):304-305
- Ohki, S., K. Nasuda, Y. Mori and H. Katsuta, 1991. *In vitro* nursery system for vegetable crops-Tomato and melon. In "Biotechnology in agriculture and forestry. Vol.17 High-tech and micropropagation I" Y.P.S. Bajaj (ed.). 345-358. Springer-Verlag. Berlin.
- Oridate, T. and K. Oosawa, 1986. Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension callus culture in melon (*Cucumis melo* L.). Jpn. J. Breed., 36:424-428.
- Oridate, T., H. Atsumi, S. Ito and H. Araki, 1992. Genetic difference in somatic embryogenesis from seeds in melon (*Cucumis melo* L.). Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 29:27-30.
- Ronchi, V.N., L. Giorgetti, M. Tonelli and G. Martni, 1992a. Ploidy reduction and genome segregation in cultured carrot cell lines. I. Prophase chromosome reduction. Plant cell, Tiss. Org. Cult., 30:107-114.
- Ronchi, V.N., L. Giorgetti, M. Tonelli and G. Martni, 1992b. Ploidy reduction and segregation in cul-

- tured carrot cell lines. II. Somatic meiosis., Plant cell, Tiss. Org. Cult., 30:115-119.
- Sasaki, T., T. Kinoshita and M. Takahashi, 1973. Estimation of the number of genes in the germination ability at low temperature in rice. J. Fac. Agr. Hokkaido Univ. 57:301-310.
- Sengupta, J. and S. Sen, 1987. Comparative analysis of the effect of growth hormone on morphology and cytology of callus culture of *Crepis ectorum* L. Caryologia 40:221-228.
- Sengupta, J., G.C. Mitra and A.K. Sharma, 1987. Study of chromosomes in two callus lines and in regenerated plants of *Kallstroemia pubescens* (G. Don) Dandy. Cytologia 52:767-770.
- 下西恵・永井輝行・野村幸雄・吉岡啓子・大澤勝次, 1993. メロンの苗条原基誘導と植物体再生能力の維持. 植物組織培養, 10:17-24.
- Simon, I., E. Racz and J.M. Zatyko, 1987. Preliminary notes on somaclonal variation of strawberry. Fruit Sci. Rep. 14:151-154.
- 志村令郎, 1992. 最新シロイヌナズナ研究事情—遺伝子発現の分子生物学. 遺伝, 46:10-43.
- Stephens, P.A., C.D. Nickell and J.M. Widholm, 1991. Agronomic valuation of tissue-culture-derived soybean plants. Theor. Appl. Genet. 82: 633-635.
- 末松信彦・大塚寿夫・戸田幹彦, 1986. メロンの組織培養 (第1報) 葉片からの植物体再生. 静岡農試研報 31:31-37.
- 鈴木英治郎 1958. マスクメロンに関する研究 (第1報) 自然発生の四倍性個体について. 静岡大学教育学部研報 9:169-176
- 鈴木英治郎 1959. マスクメロンに関する研究 (第3報) 三倍性交雑 $4x \times 2x$ について. 静岡大学教育学部研報 10:218-224.
- 鈴木英治郎 1960. マスクメロンに関する研究 (第4報) 三倍性逆交雑 $2x \times 4x$ について 静岡大学教育学部研報 11:176-186.
- Tabai, Y., T. Kanno and T. Nishio, 1991. Regulation of organogenesis and somatic embryogenesis by auxin in melon, *Cucumis melo* L. Plant Cell Rep. 10:225-229.
- Tanaka, R. and H. Ikeda, 1983. Perennial maintenance of annual *Haplopappus gracilis* ($2n=4$) by shoot tip cloning. Jpn. J. Genet. 58:65-70.
- 谷口研至・田中隆荘, 1988. 育種学最近の進歩第29集. 105-114.
- Tang, D., J. Zhang, G. Xu, Y. Niu and C. Tsui, 1980. The effect of plant hormones on callus formation and plantlet regeneration in *Cucumis melo*. Acta Botanica Sinica 22:132-135.
- Toyoda, H., K. Shimizu, K. Chatani, N. Kita, Y. Matsudo and S. Ouchi, 1989. Selection of bacterial wilt-resistant tomato through tissue culture. Plant Cell Rep. 8:317-320.
- Toyoda, H., Y. Hosoi, A. Yamamoto, T. Nishiguchi, K. Maeda, T. Takebayashi, T. Shiomi and S. Oouchi, 1991. Transformation of melon (*Cucumis melo* L.) with *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Tissue Cult. Lett., 8:21-27.
- 豊田秀吉・細井好之・前田和彦・竹林晃男・中東豊・大内成志 1991. メロン葉プロトプラストからの個体再生. 植物組織培養 8:118-120.
- Toyoda, H., K. Horikoshi, Y. Yamada and S. Ouchi, 1991. Selection for *Fusarium* wilt disease resistance from regenerants derived from leaf callus of strawberry. Plant Cell Rep. 10:167-170.
- Trusson, A.J. and E.A. Shahin, 1986. *In vitro* plant regeneration in the genus *Cucumis*. Plant Sci. 47:35-43.
- Vallejos C.E. and S.D. Tanksley 1983. Selection of isozyme makers and cold tolerance in an interspecific backcross of tomato. Theor. Appl. Genet. 66:241-247.
- Wagenvoort, M. and W. Lange, 1975. The production of aneuploids in *Solanum tuberosum* L. group

- Tuberosum* (the common potato). *Euphytica* 24: 731-741.
- Wang, W.C., J.R. Myers and G.B. Collins, 1991. Selection of atrazine-resistant variants from photomixotrophic cultures. *Plant Sci.* 73:199-209.
- Wenzel G. and B. Foroughi-Wehr, 1990. Progeny tests of barley, wheat and potato regenerated from cell cultures after *in vitro* selection for disease resistance. *Theor. Appl. Genet.* 80:359-365.
- Yakuwa, T. and T. Harada, 1984. Studies on the breeding of all-male cultivar in asparagus. III. Response to the *in vitro* culture in a supermale plant (MM-1'. *J. Fac. Agric. Hokkaido Univ.* 61:426-435.
- 山中寿子・天笠一美・吉田裕 1990. メロンの子葉プロトプラストからの植物体再生. *植物組織培養* 7:103-107.
- Yoshioka, K., K. Hanada, Y. Nakazaki, M. Minobe, T. Yakuwa, K. Oosawa, 1992. Successful transfer of the cucumis mosaic virus coat protein gene to *Cucumis melo* L. *Jpn. J. Breed.*, 42:277-285.
- Young, H., R.M. Skirvin and J.A. Juvick, 1983. Development of embryoid-like structures from *Cucumis melo* L. callus *in vitro*. *Cuc. Genet. Coop.* 6:56-57.
- 庄東紅・北島宣・石田雅士・傍島善次 1990. 栽培カキの染色体について. *園学雑* 59:289-297.

XI Summary

Studies on Somaclonal Variations in Tissue Culture of Melon (*Cucumis melo* L.) and its Utilization

Hiroshi EZURA

Plant Biotechnology Institute,
Ibaraki Agricultural Center,
Iwama, Nishi-ibaraki, Ibaraki, 319-02 Japan

Plant regeneration from adventitious buds, somatic embryos, shoot primordia and axillary buds is possible in melon (*Cucumis melo* L.). In order to apply these culture system for the improvement of melon, it is important to determine the frequency with such somaclonal variation occurs following regeneration from each of the above tissues.

In this thesis, I investigated the following 1) differences in frequency of somaclonal variation in plants regenerated from the different tissue culture systems mentioned above, using polyploidy as an indicator, and 2) a cytological analysis of the appearance of these polyploids. Further, I investigated the usefulness of these tissue culture systems for improving melon by doing following experiments 1) production of triploids and aneuploids in crosses using the tetraploid obtained from the tissue culture systems and 2) selection of somaclonal variants with an improved fruit thickening ability at low temperature, one of the most important characteristics in the cultivation of melon in the field.

Somaclonal variants can be altered in various characteristics including morphological, developmental, ecological and physiological traits. However, it is impossible to check all of these traits in measure of the frequency of somaclonal variation. Therefore, measurement of the frequency of somaclonal variation requires an indicator which is easy to observe. In preliminary experiments with plants

regenerated from somatic embryos, it was clear that polyploid plants, especially tetraploids, appear at high frequency. Accordingly, the frequency of appearance of polyploids amongst plants regenerated from the four different culture systems (adventitious bud organogenesis, somatic embryogenesis, shoot primordia formation and axillary branches), was compared using three different cultivars, Prince, Andes and Amus as explant source. Tetraploids were observed in the regenerated plants of all cultivars, other class of polyploid and aneuploid were not observed. The frequency of tetraploidy was higher in plants regenerated from adventitious buds and somatic embryos, at 31% and 30%, respectively. The frequency of tetraploidy in plants regenerated from shoot primordia was 4%. No tetraploids were observed in plants regenerated from axillary buds. Thus, it was considered that adventitious organogenesis and somatic embryogenesis are apt to induce somaclonal variation in the form of polyploids when used for plant regeneration. These methods provide efficient methods for the production of polyploids.

In plants regenerated from adventitious buds and somatic embryos, tetraploidy was observed at high frequency. In order to apply these systems to the improvement of melon it is important to understand how this tetraploidy arise. This was investigated as follows. Firstly, in experiments, in which diploid plants were used as the source of explants changes in the ploidy of cells was observed at an early stage in

the culture. Secondly, in experiments using tetraploids as the source of the explants, the ploidy of regenerated plants was determined.

The ploidy of callus cells was determined after 5, 7 and 14 days of culture of diploid explants, and showed that polyploidization progressed rapidly during early stages of culture. A few percent of aneuploid cells were observed. However, the regenerated plants were diploid, tetraploid or mixoploid of diploid and tetraploid cells, suggesting that plants regenerated selectively from diploid and tetraploid cells in melon. On observation of the chromosomes of the cells of callus tissue, somatic embryos and regenerated plants, a variety of polyploid and aneuploid cells was observed in the callus tissue. However, cells of somatic embryos were uniformly diploid, tetraploid or octoploid, whilst regenerated plants were diploid or tetraploid. These observations suggest that somatic embryos differentiate selectively from diploid, tetraploid and octoploid cells and that regenerated plants differentiate preferentially from diploid and tetraploid embryos. Regenerated plants obtained via adventitious organogenesis and somatic embryogenesis in which tetraploid melon was used as the source of explant were all tetraploid. These results suggest that tetraploids appear at high frequency during melon tissue culture due to the following processes. 1) Polyploidization progresses rapidly during culture. 2) Diploid, tetraploid and octoploid adventitious buds and somatic embryos differentiate selectively from the cell in the culture. 3) Plants regenerate preferentially from diploid and tetraploid adventitious buds and somatic embryos.

Melon plants regenerated through tissue culture were diploid, tetraploid and mixoploid of diploid and tetraploid cells. Other classes of polyploid and aneuploid might be useful for the improvement and genetic analysis of melon. Thus, production of triploids and aneuploids was attempted, using the tetraploids generated via tissue culture. Firstly, diploids and tetraploids were crossed reciprocally. In diploid x tetraploid crosses, abnormal embryos, with

incompletely developed cotyledons, were obtained. These embryos were germinated *in vitro* on MS medium. All of the plants obtained were triploid. The number of triploids obtained per fruit was 6.8-17.2, a frequency higher than that of conventional methods for obtaining triploids. In tetraploid x diploid crosses, no embryos were obtained. Secondly, diploids and the triploids were crossed reciprocally. In triploid x diploid crosses, immature seeds were obtained. When these were cultured *in vitro* on MS medium, embryo-like organs appeared from inside of the seed. Regenerated plants were obtained by subculturing these embryo-like organs on MS medium. Chromosome number determination revealed that four out of five regenerated plants were aneuploid and the chromosome numbers were $2n=27, 35, 45$ and 46 , respectively. It was concluded that triploid and aneuploid plants can be obtained by incorporating embryo culture techniques into conventional crossing programs.

Finally, I attempted to select somaclonal variants displaying an improved fruit thickening ability at low temperature, from progenies of plants regenerated from culture of adventitious buds and somatic embryos. Accordingly, I carried out following experiments: development of methods for selection for improved fruit thickening ability at low temperature, selection of variants with these methods, and estimation of the field performance of the selected variants.

In melon, it is necessary to develop an efficient method for selecting variants with improved fruit thickening ability because cultivation is troublesome and it is difficult to cultivate a lot of plants. It is possible to select variants effectively from a large population if an early stage of growth characteristic is used as an indicator. Accordingly, I attempted to develop a selection method which used a germinability as the indicator. Seeds from selfed-progenies of the cultivar Andes were divided into two groups with germinability at 17°C for 5 days, CT group, 20% of the population, which could germinate, and CS group, 80% of the

population, which could not. These two groups were cultivated at low temperature and thickening ability of the fruit was compared. The CT group contained two types of plants, one which set a larger fruit and the other a smaller one. In contrast, CS group plants set a smaller fruit. Therefore, it was concluded that it is possible to eliminate plants which have poorer fruit thickening ability by using low temperature germinability as an indicator. It was decided to do the selection at 15 °C for 5 days because under such conditions the melon cultivar used in this experiment could not germinate.

Somaclonal variants with low temperature germinability were selected from self-pollination progenies of plants regenerated (R_0) from adventitious buds or somatic embryos. When 28,105 seeds (R_1) obtained from self pollination of regenerated plants of cultivars Andes and Ams were sown at 15°C for 5 days, 0.5% of the seeds germinated. Subsequently, when 6,198 seeds (R_2) obtained from self-pollination of the selected plants were sown at 14°C for 7 days, 2.5% of the seeds germinated. When the seeds (R_3) of 47 lines selected from progenies of regenerated plants of cultivar Andes were sown at 15°C for 5 days, the germination percent of 37 of these lines was higher than that of cultivar Andes. Subsequently, when they were left at room temperature, the germination percent of 45 of the lines became higher than that of cultivar Andes. These results indicated that the selection was effective for selecting variants with a low temperature germinability in melon. It was also supposed that the low temperature germinability was controlled by more than two gene loci because the germination percent of the selected lines was different from 10% to 100%.

Forty-seven of the lines selected from the progenies of regenerated plants of cultivar Andes were grown in the field in low temperature conditions. Fruits harvesting was possible in 31 of the 47 lines, the remaining

lines had poor fruit set due to a low frequency of female flowers or were not harvested because many of the fruits cracked before harvesting. The fruits of 15 of the 31 lines were larger than those of cultivar Andes. Comparisons of the growth rate of fruits at the early, middle and last stages of fruit development showed that the frequency of lines displaying a greater fruit growth rate than that of cultivar Andes was 43%, 65% and 19%, respectively, suggesting that lines displaying a greater fruit thickening ability at the middle stage were selected preferentially by this selection method. These results demonstrate that efficient selection of somaclonal variants displaying improved fruit thickening ability is possible using low temperature germinability as an indicator.

This thesis highlights the following problems. 1) It is necessary to develop a method for controlling polyploidization before applying tissue culture systems to the improvement of melon. 2) Efficient methods for producing haploids has been established in melon. It should be possible to produce dihaploids by incorporating adventitious organogenesis and somatic embryogenesis into the method. 3) It should be possible to select somaclonal variants which have useful characteristics such as resistance to pathogens, qualities and ecological traits. 4) Difference of low temperature germinability between selected variants and the original plants is very clear. It should be possible to understand a basic mechanism for low temperature germinability by comparing them physiologically. 5) It will be necessary to carry out a genetic analysis of low temperature germinability and low temperature fruit thickening ability if the selected variants are to be applied in melon improvement.

茨城県農業総合センター生物工学研究所研究報告，第1号

平成7年2月20日発行

発行所 茨城県農業総合センター生物工学研究所
〒319-02 西茨城郡岩間町安居 3165-1
電話 0299-45-8330

印刷所 有限会社 新生プリント
〒310 水戸市見川2丁目28-18

Bulletin
of the
Plant Biotechnology Institute
Ibaraki Agricultural Center
No.1 (1995)

Contents

Studies on Somaclonal Variations in Tissue Culture of Melon (*Cucumis melo* L.) and
its Utilization

Hiroshi EZURA

Plant Biotechnology Institute
Ibaraki Agricultural Center
Ago, Iwama, Nishi-Ibaraki, Ibaraki 319-02, Japan