

長期間培養したサトイモのカルスから再生した植物の形態および収量

村上 賢治・松原 幸子
(生物機能・遺伝資源開発学講座)

Morphological Characters and Yields of Regenerated Plants from Callus Cultured for Long Period in Taro

Kenji Murakami and Sachiko Matsubara
(Department of Biological Function and Genetic Resources Science)

Characters of plants regenerated from calli cultured for long period in taro (*Colocasia esculenta* Schott cv. Eguimo) were studied.

Calli were obtained by culturing etiolated stem segments on Murashige and Skoog's (MS) medium supplemented with 30 g·liter⁻¹ sucrose, 2 mg·liter⁻¹ NAA and 2 mg·liter⁻¹ 2 ip. They were proliferated by subculturing on the same fresh medium for 10 or 15 months from initial planting. Plants regenerated after transferring them to hormone-free MS medium.

months (C-15) was more round than that of control plants. Corm shape of C-15 plants was more round than that of control plants.

Key words : taro, callus, long-term culture, regenerated plants

緒 言

サトイモ (*Colocasia esculenta* Schott) は、日本では重要な根菜であり、同じ種のタロイモは世界的にみて重要な食用作物である。サトイモには多くの品種があるが、'えぐいも'を除き開花は非常にまれであり、また栽培上重要な品種はすべて3倍体のため結実しない。以上の理由から、サトイモの交雑育種は非常に困難である。このような作物の育種においては、細胞融合による体細胞雑種の利用の他に、突然変異の利用が考えられる。

突然変異育種と細胞培養を組み合わせた技術として、細胞選抜育種法がある。これは、耐塩性など細胞レベルでも選抜できる有用な形質を持った突然変異細胞を作出して選抜し、そこから植物を再生させようとする試みである。この方法で問題となるのは、体細胞突然変異により有害な変異も同時に起きるこ

とである。Nymanら(1983)は、サトイモの細胞選抜による耐塩性作物の育成を試みたが、再生した植物は生長が著しく悪く、土壌に植えるとすぐに枯死した³⁾。細胞選抜による育種においては、このような有害な変異をできるだけ抑制することが必要である。本研究は、サトイモの細胞選抜による耐塩性品種育成のための基礎実験として、長期間培養したカルスから再生した植物に、体細胞突然変異がどのように現れるかについて検討するために行った。

材料と方法

岡山大学農学部附属農場で栽培・維持しているサトイモ (*Colocasia esculenta* Schott) の品種'えぐいも'を供試した。カルス誘導のための外植体には、筆者らが以前に行った実験と同様、黄化茎の切片を用

Received October 1, 1997

いた¹⁾。0.2mg・liter⁻¹ NAA を添加した基本培地に、球茎の芽の茎頂を植え付け、1500lx、25℃で培養した。基本培地には、Murashige and Skoog (1962) (MS)²⁾の無機塩に、100mg・liter⁻¹ myo-イノシトール、2mg・liter⁻¹ グリシン、0.5mg・liter⁻¹ ニコチン酸、0.5mg・liter⁻¹ 塩酸ピリドキシン、0.1mg・liter⁻¹ 塩酸チアミンおよび30g・liter⁻¹ のショ糖を添加し、2g・liter⁻¹ ジェランガムでゲル化したものを用いた。40~50日間培養して伸長した苗条を、同組成の新しい培地に移植して暗黒下で培養し、黄化茎を伸長させた。この黄化茎を約5mmの長さの切片に切り分け、2mg・liter⁻¹ NAA+2mg・liter⁻¹ 2ip を添加した基本培地に植え付けた。培養には培地を30mlずつ分注した100ml三角フラスコを用いた。植え付け後は、1500lx、25℃で培養した。60日間培養後、同組成の新しい培地に移植した。その後は約1ヵ月ごとに同組成の新しい培地に継代培養して増殖・維持した。このカルス組織のパラフィン切片を常法により作成し、組織の観察を行った。

初代培養から通算して10ヶ月または15ヶ月培養後、カルスをホルモン無添加のMS培地に移植した。移植30日後、再生した植物を順化した。これらの植物を、7月11日にビニルハウス内の地面に植え付けて栽培し、10月31日に地下部を掘り上げた。初代培養から通算して10ヶ月間培養したカルスから再生した植物をC-10系統、15ヶ月間培養したカルスから再生した植物をC-15系統、および元の‘えぐいも’在来系統を対照系統とし、各系統の球茎を翌年の形質調査の実験に供試した。

前述のようにして得られた各系統の3~5gの球茎を、1995年4月21日に18cm径ポットに1球ずつ植え付け、適宜灌水し栽培した。1~2葉展開した5月26日に、雨よけハウス内の地面に1系統あたり10株ずつ、株間30cm、畝間80cmで定植し、慣行法で栽培した。8月31日から9月1日に草丈、苗条数、葉数、葉身の長さ、葉柄と葉身のなす角度について調査を行った。11月7~9日に地下部を掘り上げ、球茎数、球茎の重さ、球茎の長さ、直径の調査を行った。球茎の調査については、種芋上に形成した球茎を親芋(corm)、親芋上に形成した球茎を子芋(first cormel)、子芋上に形成した球茎を孫芋(second cormel)とし、それぞれに分けて調査を行った。

結 果

黄化茎切片を2mg・liter⁻¹ NAA+2mg・liter⁻¹ 2ip を添加した基本培地で培養後形成されたカルスは、白色で粒状の組織で、表面に苗条の原基とみられる緑色の粒がみられた (Fig. 1)。カルス組織の切片を作成し観察したところ、細かい細胞が密集し盛んに細胞分裂しているとみられる部分と、細胞が大きく細胞の密度が低い部分が混在していた (Fig. 2)。このカルスは、ホルモン無添加培地に移植すると容易

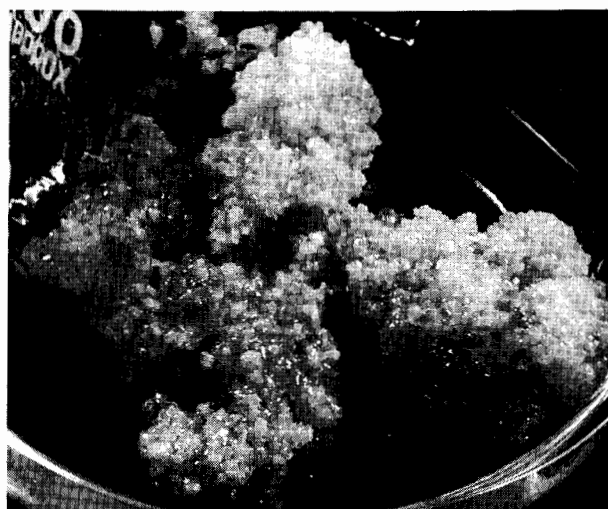


Fig. 1 Calli cultured on Murashige and Skoog's (MS) medium supplemented with 2 mg・liter⁻¹ NAA and 2 mg・liter⁻¹ 2 ip.

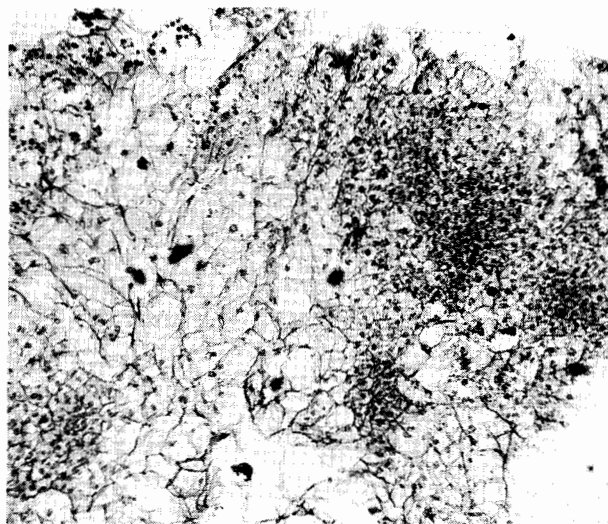


Fig. 2 Section of callus cultured on MS medium supplemented with 2 mg・liter⁻¹ NAA and 2 mg・liter⁻¹ 2 ip.

に植物体が再生した。

草丈、苗条数および葉数については、系統間で有意差がみられなかった (Table 1)。葉の形については、15ヶ月間培養したカルスから再生したC-15系統が、他の2系統よりも、葉身の長さ/幅の比率が小さく、葉身が丸かった (Table 2)。また、葉身の主脈と葉柄がなす角度を測定したところ、15ヶ月間培養したカルスから再生したC-15系統が、他の2系統よりも角度が大きかった (Table 2)。

株あたり球茎の合計重は、対照系統が最も重く、15ヶ月間培養したカルスから再生した植物は最も軽く、対照系統の2分の1に近い値であった (Fig. 3)。株あたり球茎の数は、系統間で有意差はなかった (Table 3)。子芋 (first cormel) と孫芋 (second cormel) について、球茎の丸さの指標となる長さ/直径の比率をみたところ、15ヶ月間培養したカルスから再生したC-15系統の孫芋は、他の2系統よりも値が大きく、球茎が丸かった (Table 3)。

考 察

本実験の結果、サトイモの長期間培養したカルスから再生した植物は、収量が低下し、品質上重要である芋の形にも変異が生じることがわかった。そして、培養期間の長いカルスから再生した植物ほど、収量低下の程度が大きいことが示された。この原因として、カルスの形成・増殖や、再分化の過程で遺伝子に変異が生じ、それが集積したことが考えられる。このようなカルスの形成・増殖や、再分化の過程で起こる変異については、近年多くの植物について研究がなされるようになり、トウモロコシの体細胞突然変異についてトランスポゾンの活性化が大きな原因であることが示されている^{4,5)}。この変異を抑制する方法としてまず考えられるのは、カルスの培養期間をなるべく短くすることである。細胞選抜を行うためには、一定期間カルスや懸濁細胞培養を行うことは避けられないが、本実験で10ヶ月間培養したカルスから再生した植物でも収量の低下がみられたことから、これよりも培養期間を短くするのが望ましいと考えられた。また、15ヶ月間培養したカルスから再生した植物は、葉身が上を向き、葉身の形が丸くなるといった外観上の変化がみられたことから、これを変異個体の指標とし、変異の程度の小さい個体を選抜していくことも考えられた。

Table 1 Shoot growth of plant regenerated from callus

Line ^{a)}	Plant height (cm)	Number of shoot per plant	Number of leaves per plant
Control	97.7a ^{b)}	6.0a	15.9a
C-10	106.7a	7.1a	18.7a
C-15	95.7a	5.0a	14.4a

a) Control: Original 'Eguimo' line

C-10: Plants regenerated from callus cultured for 10 months

C-15: Plants regenerated from callus cultured for 15 months

b) Mean values within each column followed by the same letter are not significantly different ($p=0.05$, Duncan's multiple range test).

Table 2 Morphological characters of leaf in plant regenerated from callus

Line ^{a)}	Length/width of leaf blade	Angle ^{b)} of leaf blade (°)
Control	1.22a ^{c)}	78b
C-10	1.26a	80b
C-15	1.14b	89a

a) See Table 1.

b) Internal angle of divergence between petiole and main vein of leaf blade

c) See Table 1.

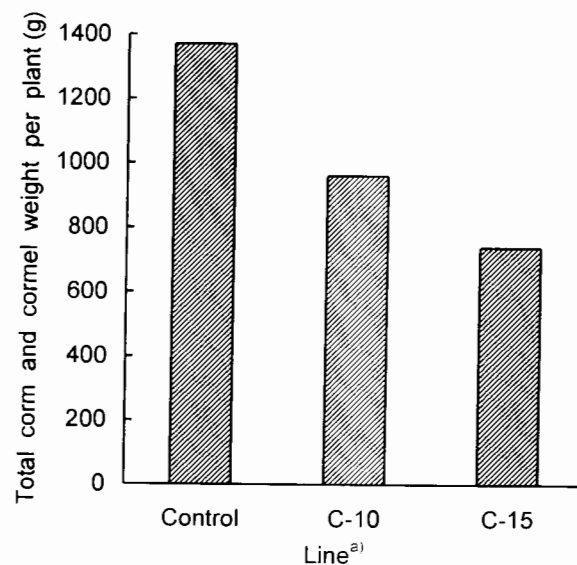


Fig. 3 Total corm and cormel weight in regenerated plants from calli.

a) See Table 1.

Table 3 Number and morphological characters of corm and cormel in plant regenerated from callus

Line ^{a)}	Total number of corms per plant	Ratio of length/diameter	
		First cormel ^{b)}	Second cormel ^{c)}
Control	24a	1.78a	1.29a
C-10	20a	1.80a	1.23a
C-15	23a	1.63a	1.02b

a) See Table 1

b) Lateral corm developed on the main corm

c) Lateral corm developed on first cormel

細胞選抜で耐塩性など有用な変異を選抜するためには、同時に生じる有害な変異をできるだけ抑制し、除去していかなければならない。本実験で得られた結果は、サトイモの細胞培養における有害な変異の抑制と、除去を行う上での基礎的知見となりうると考えられた。

要 約

サトイモの品種‘えぐいも’を供試し、長期間培養したカルスから再生した植物の収量と、形態について調べた。

黄化茎切片を $2 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ NAA + $2 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ 2 ip を添加した基本培地で培養し、カルスを形成させた。カルスは約1ヵ月ごとに同組成の新しい培地に継代培養して増殖・維持した。初代培養から通算して10ヶ月または15ヶ月培養後、カルスをホルモン無添加のMS培地に移植し、再生した植物を順化した。これらの植物から繁殖した球茎を、翌年植え付けて栽培し、収量などの調査を行った。その結果、長期間培養したカルスから再生した植物は、元の‘えぐいも’植物と比較して収量が低かった。また、15ヶ月間培養したカルスから再生した系統は、葉身が丸く、丸い球茎を形成した。

謝 辞

この研究は平成6年度から8年度までの3年間に亘る岡山大学内特定研究『特殊環境生物の機能開発と物質生産への応用』を分担して行ったものである。また、本研究を遂行するにあたり、学生の木村学氏と小川浩太郎氏にご助力頂いた。ここに記して感謝の意を表します。

文 献

- 1) 村上賢治・横山裕彦・松原幸子：サトイモの黄化茎からのカルス形成と植物体再生。園学雑, **61**(2), 367-374 (1992)
- 2) Murashige, T. and F. Skoog : A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497 (1962)
- 3) Nyman, L. P., C. J. Gonzales and J. Arditti : *In-vitro* selection for salt tolerance of taro (*Colocasia esculenta* var *antiquorum*). *Ann. Bot.*, **51**, 279-286 (1983)
- 4) Peschke, M. V., R. L. Phillips and B. G. Gengenbach : Discovery of transposable element activity among progeny of tissue culture-derived maize plants. *Science*, **238**, 804-805 (1987)
- 5) Peschke, M. V. and R. L. Phillips : Activation of the maize transposable element *Suppressor-mutator* (*Spm*) in tissue culture. *Theor. Appl. Genet.*, **81**, 90-97 (1991)