

# サトイモの品種 '八頭' のカルスおよびプロトプラストから再生した植物にみられた体細胞突然変異

村上 賢治・西岡 順子・松原 幸子  
(生物機能・遺伝資源開発学講座)

## Somaclonal Variation in Plants Regenerated from Callus and Protoplasts of Taro cv. 'Yatsugashira'.

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

Characters of plants regenerated from callus and protoplasts of taro (*Colocasia esculenta* Schott cv. Yatsugashira) were studied.

Many green compact cell masses (calloid) and a small number of yellow friable calli were formed by culturing segments of etiolated stem on Murashige and Skoog's (MS) medium supplemented with 30 g · liter<sup>-1</sup> sucrose, 1 mg · liter<sup>-1</sup> 2,4-D and 2ip. Friable calli were proliferated by subculturing on the same fresh medium, and then they were suspension-cultured in a liquid medium. Protoplasts were isolated from these suspension cells.

Shoots were regenerated from calloids, friable calli and protoplast derived-calli by transferring them to MS medium supplemented with 30 g · liter<sup>-1</sup> sucrose, 0~2 mg · liter<sup>-1</sup> NAA and 2 mg · liter<sup>-1</sup> BA or 2 ip. These shoots formed roots after being transferred to basal MS media. Plantlets were acclimatized and grown in the field.

Original 'Yatsugashira' formed many shoots from the main corm, whereas 2 of 4 plants regenerated from calloid formed a single shoot from the main corm. Plants regenerated from friable calli were dwarf type and grew slowly. Plants regenerated from both friable calli and protoplasts formed larger number of shoots than original 'Yatsugashira'.

Key words : taro, somaclonal variation, callus, protoplast

### 緒 言

日本で栽培されているサトイモ品種は、開花・結実がまれであることから、交雑による新品種の育成は困難である。このことから、サトイモの育種においては細胞融合による体細胞雑種利用の意義が大きいと考えられる。

単子葉植物のプロトプラスト培養では、一般的にカルスを誘導して振とう培養し、懸濁培養細胞からプロトプラストを単離している。この方法で問題と

なるのは、カルスの誘導と増殖の際に生じると考えられる体細胞突然変異である。単子葉植物のプロトプラストから再生した植物にみられた体細胞突然変異については、イネを始め多くの報告がある<sup>2)</sup>。しかし、サトイモのプロトプラストから再生した植物の形質に関しては、まだ報告はみられない。

本研究では、サトイモの品種 '八頭' を供試し、カルスやプロトプラストから再生した植物の形質を調

---

Received October 1, 1997

査して、体細胞突然変異の原因と抑制方法について検討した。

### 材料と方法

本実験には、サトイモ (*Colocasia esculenta* Schott) の品種‘八頭’を供試した。この品種の種芋を赤松種苗 (大阪) で購入し、岡山大学農学部の研究圃場で栽培し繁殖させ実験に用いた。

#### 黄化茎の伸長

Murashige and Skoog 1962<sup>5)</sup> MS の無機塩に、100 *myo*-イノシトール、2 グリシン、0.5ニコチン酸、0.5塩酸ピリドキシン、0.1塩酸チアミン (単位:  $\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$  および  $30 \text{ g} \cdot \text{liter}^{-1}$  ショ糖を添加し、 $2 \text{ g} \cdot \text{liter}^{-1}$  ジェランガムでゲル化したものを基本培地として用いた。0.2 $\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$  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°C で培養した。培養開始後40~50日間で伸長した苗条を、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。

#### 黄化茎切片からの緑色塊状組織の形成と植物体再生

伸長した黄化茎の切片を、 $1 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$  2, 4-D +  $1 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$  2 ip を添加した基本培地に植え付け、1500lx、25°C で培養した。培養には100ml三角フラスコを5本用い、各フラスコに培地を30mlずつ分注した。そして、1フラスコあたり外植体を5個ずつ植え付けた。約6ヶ月間培養後、形成した緑色から黄緑色の固い塊状の組織 (以後これを緑色塊状組織とする) を、同組成の培地に継代しさらに2ヶ月間培養した。その後、緑色塊状組織を約7mm角に切り分け、ホルモン無添加および  $2 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$  BA 添加の MS 培地にそれぞれ15外植片を移植した。

#### 柔らかいカルスの誘導と植物体再生

黄化茎切片25個を  $1 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$  2, 4-D +  $1 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$  2 ip を添加した基本培地で約6ヶ月間培養後、増殖した緑色塊状組織の中から黄白色の柔らかい部分を3個選び、同組成の新しい培地に移植した。移植2ヶ月後、同組成の培地に移植したところ、1ヶ月間培養後にはほぼ均一な組織の柔らかいカルスとなった。このカルスの一部を、ホルモン無添加、 $2 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$  BA または  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$  NAA +  $2 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$  BA を添加した基本培地の3種類の再生用培地に移植し、植物体を再生させた。残りのカルスは同組成の新しい培地に継代培養し、約1ヶ月間培養

したものを後に述べるプロトプラスト培養の材料に用いた。

#### プロトプラストの単離と培養

前述のようにして得られた柔らかいカルスを、 $1 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$  2, 4-D +  $1 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$  2 ip を添加した MS 液体培地に入れ、25°C、200~300lxの照明下で、100 rpm の回転振とう培養を行った。培養を開始して10~15日後、ステンレスのふるいを用いて500~45  $\mu\text{m}$  の小細胞塊を集め、 $1 \text{ g} \cdot \text{liter}^{-1}$  ペクトリアーゼ Y-23 +  $5 \text{ g} \cdot \text{liter}^{-1}$  セルラーゼオノズカ RS +  $5 \text{ mM}$  MES +  $1 \text{ mM}$   $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$  +  $0.5 \text{ M}$  マニトールの組成の酵素液に懸濁した。25°C、200~300lxの照明下で、この懸濁液を100 rpm で3.5時間振とう後、プロトプラストを集め、 $5 \text{ mM}$  MES +  $1 \text{ mM}$   $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$  +  $0.5 \text{ M}$  マニトールを含む液で3回洗浄した。洗浄後、1/2濃度の MS 無機塩、Kao and Michayluk (1975)<sup>3)</sup> の有機添加物、 $0.1 \text{ M}$  グルコース、 $0.3 \text{ M}$  マニトールおよび植物ホルモンを含む液体培地にプロトプラストを1mlあたり  $5 \times 10^5$  個の密度で懸濁した。添加植物ホルモンの組成は、0, 0.2,  $2 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$  の NAA と  $2 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$  BA または 2 ip を組み合わせた6種類とした。プロトプラスト植え付け2ヶ月後に形成した小カルスを、それぞれ初代培養と同組成の植物ホルモンを添加した基本培地 (固体培地) に移植し、植物体を再生させた。

#### 緑色塊状組織およびカルスから再生した植物の生育および球茎の収量

緑色塊状組織から再生した植物の栄養繁殖3系統、カルスから再生した植物を栄養繁殖した1系統 (C-1系統)、対照として在来の‘八頭’およびその近縁種の‘唐芋’を供試した。各品種・系統の5~15gの重さの球茎を1996年5月11日に、ビニールポット (直径12cm) に植え育苗し、6月10日に6株ずつ露地に定植した。株間は40cm、畝間は100cmとした。調査は、草丈と苗条数を8月28~29日に、球茎の数と重さを10月24日に行った。

#### カルスおよびプロトプラストから再生した植物の生育

プロトプラストから再生した植物を試験管で培養している段階で、分けつの多いタイプと分けつの少ないタイプの個体がみられたので、それぞれ P-1 と P-2 系統とし、1年間栽培して栄養繁殖させた。この繁殖した球茎を実験に供試した。1996年5月11日に、対照系統、カルスから再生した植物を栄養繁殖

した前述のC-1系統, およびプロトプラストから再生した植物のP-1およびP-2系統を供試し, それぞれの重さ1g前後の球茎を, 12cm径ポットに植え, その後7月13日に18cm径ポットに植え替え栽培した. 無加温ガラス室内で栽培し, 栽培期間中適宜液肥を施用した. 供試個体数は系統あたり6~13個体とした. 調査は, 苗条数と葉数を8月28~29日に, 8月28~30日に草丈の調査を行った.

## 結 果

### 黄化茎切片から形成した組織の形状

黄化茎切片の初代培養で形成した組織のほとんどは, 緑色から黄緑色の固い塊状(緑色塊状組織)であった(Fig. 1). この組織のパラフィン切片を作成し観察したところ, 表面近くに細かい細胞がみられ, 細胞分裂が盛んであることが示唆された. 内部の細胞は細胞壁が発達し大きなものが多かった. この緑



Fig. 1 Green, compact cell masses (calloid) formed from stem segments.



Fig. 2 Friable calli cultured on MS medium supplemented with  $1 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$  2,4-D and  $1 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$  2 ip.

色塊状組織は, Nymanら(1983)の報告<sup>6)</sup>にあるサトイモの茎頂から形成された'calloid'と同様のものとみられた. 一方, 黄白色の柔らかいカルスが, 培養した25外植体のうち3個で形成された. このような柔らかいカルスの形成は, 初代培養のみで観察された. 約1ヶ月ごとに柔らかいカルスを同組成の培地で継代培養すると, 増殖の速い均一なカルスとなった(Fig. 2). このカルスのパラフィン切片を作成し観察した結果, 細胞壁が薄く, 分裂の盛んな丸い細胞の集合体であった.

### 緑色塊状組織からの植物体再生

25個の黄化茎切片を6ヶ月間培養後形成した緑色塊状組織を, 初代培地と同組成の培地にそのまま移植した後に1本の苗条が再生した.  $2 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$  BA添加MS培地で2回継代培養した緑色塊状組織15片から1本の苗条, ホルモン無添加MS培地で2回継代培養した緑色塊状組織15片から2本の苗条が再生した. 初代培養で再生した1本の苗条から生長した植物は, 1994年に順化して栽培し, 球茎を繁殖させた. この栄養繁殖系統をS-1系統とした.  $2 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$  BA添加MS培地で再生した1本の苗条から生長した植物は, 1995年に順化して繁殖させ, S2-1系統とした. ホルモン無添加MS培地で再生した1本の苗条から生長した植物も同様に1995年に順化して繁殖させ, その繁殖系統を, S2-2およびS2-3系統とした. S2-2とS2-3系統は, 全く同一の形態を示したため, 以後の生育試験にはS2-3系統のみ供試した.

### カルスからの植物体再生

植物体再生用培地に移植したカルスは, じだいに緑白色から緑色の固い組織に変化し, その一部から苗条が再生した. ホルモン無添加培地に移植したカルスからは順化可能な再生植物は得られなかったが,  $2 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$  BA, および $0.2 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$  NAA +  $2 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$  BA添加培地に移植したカルスから順化可能な再生植物が得られた. 1994年に $2 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$  BA添加培地で再生した植物を7個体,  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$  NAA +  $2 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$  BA添加培地で再生した植物3個体を順化し, ポット栽培を行った. 植物の形態は, 葉が小さく葉数の多い個体と, 葉が大きく葉数の少ない個体があった. 全体的にみて, 植物体は対照系統より非常に小さかった. カルスから再生した植物の内, 最も生育が良い2個体(ともに $2 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$  BA

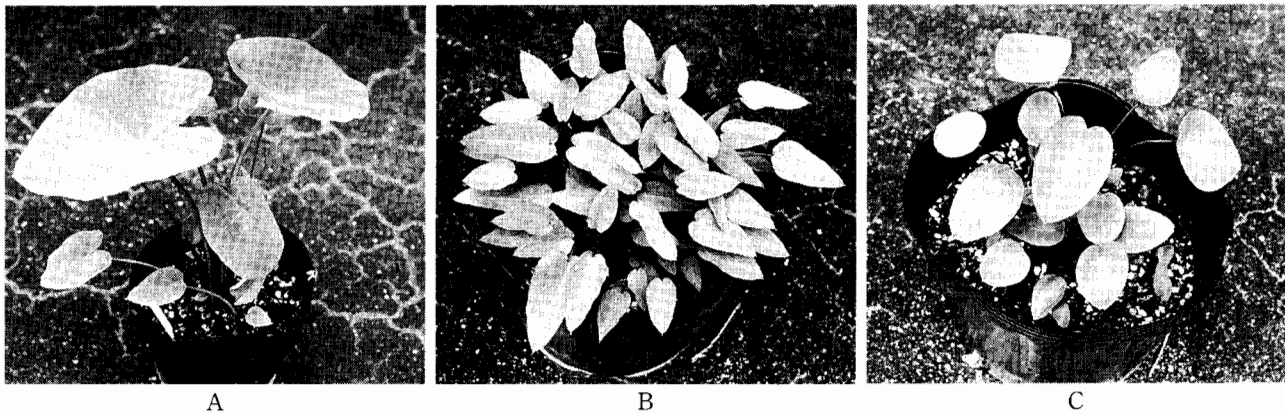


Fig. 3 Plants regenerated from protoplasts;  
A) Original 'Yatsugashira' plant  
B) C) Two different types of plants regenerated from protoplasts

添加培地で再生したもの)の球茎を残し、1995年に栄養繁殖させた。この栄養繁殖系統をC-1系統とし、1996年に生育および収量の調査を行った。

#### プロトプラストからの植物体再生

プロトプラスト培養2ヶ月後には直径2mm程度のコロニーが多数形成された。これらは最初は黄白色の柔らかいカルス状であったが、固体培地に継代培養すると緑色から緑白色の固い組織に変化し、その一部から苗条が再生した。

2 mg · liter<sup>-1</sup> NAA + 2 mg · liter<sup>-1</sup> BA, 0.2 mg · liter<sup>-1</sup> NAA + 2 mg · liter<sup>-1</sup> BA, および 2 mg · liter<sup>-1</sup> 2 ip 添加培地の3種類の培地で培養したプロトプラスト由来の再生植物を順化した。プロトプラスト由来の再生植物は、材料のカルス由来の再生植物と大きさや形態が似ており、葉数の多い個体から少ない個体まで種々のものがあつた (Fig. 3. A~C)。

#### 緑色塊状組織およびカルスから再生した植物の生育および球茎の収量

緑色塊状組織から再生したS-1系統は、元の'八頭'より草丈が高かつた (Table 1)。緑色塊状組織を 2 mg · liter<sup>-1</sup> BA 添加培地に継代培養後、再生したP-1系統は元の'八頭'と草丈に差がなかつた。緑色塊状組織をホルモン無添加添加培地に継代培養後再生したS 2-1系統は元の'八頭'より草丈が低かつた。カルスから再生したC-1系統は、草丈が最も低かつた。

'八頭'は1個の親芋から平均18.3本の苗条が伸長した (Table 1)。一方、'唐芋'の1個の親芋から伸長した苗条の数は平均1.3本であつた。S-1および

Table 1 Shoot growth of 'Yatsugashira', 'Tohnoimo', and plants regenerated from calloids and friable calli

Line <sup>a)</sup>	Plant height (cm)	Total number of sprouting shoots per plant	Number of shoots sprouting from main corm
Yatsugashira (original)	97.1 b <sup>b)</sup>	22.0 b	18.3 a
Tohnoimo	102.2 b	7.0 c	1.3 b
S-1	118.2 a	8.8 c	1.0 b
S 2-1	91.2 b	31.0 a	22.7 a
S 2-3	61.8 c	6.7 c	1.0 b
C 1	27.3 d	21.2 b	19.8 a

<sup>a)</sup> S-1, S2-1 and S2-3: Plants regenerated from calloids C-1: Plants regenerated from friable calli

<sup>b)</sup> Mean separation within each column by Duncan's multiple range test at P ≤ 0.05

S 2-3系統は、親芋から1本の苗条のみ伸長し、'唐芋'型を示した。S 2-1系統は、1個の親芋から22.7本の苗条が伸長し、'八頭'型であつた。カルスから再生した植物のC-1系統は、1個の親芋から伸長した苗条が19.8本で、'八頭'型であつた。

S-1, S 2-1系統および'唐芋'は、'八頭'と株あたり球茎重に差がなかつた (Table 2)。S-1系統の株あたり球茎数は、'八頭'や'唐芋'より少なかつた。S 2-1系統は株あたり球茎数は'八頭'より多かつた。S 2-3系統は、株あたり球茎重、球茎数とも、'八頭'の約2分の1であつた。C-1系統の株あたり球茎重は、'八頭'より著しく少なく、球茎数も22.5個と少なかつた。

#### カルスおよびプロトプラストから再生した植物の生育

対照系統、カルスおよびプロトプラストから再生した植物の球茎をポット栽培し、地上部の生育を調

**Table 2** Corm and cormel production 'Yatsugashira', 'Tohnoimo', and plants regenerated from calloids and friable calli

Line <sup>a)</sup>	Total weight of corm and cormels per plant (g)	Total number of corm and cormels per plant
Yatsugashira (original)	1562.5 a <sup>b)</sup>	40.0bc
Tohnoimo	1673.0 a	46.5ab
S-1	1817.2 a	26.2cd
S 2-1	1592.2 a	57.0a
S 2-3	710.2 b	20.3d
C-1	333.5 b	22.5d

<sup>a)</sup> See Table 1.

<sup>b)</sup> Mean separation within each column by Duncan's multiple range test at  $P \leq 0.05$

べた結果を Table 3 に示した。カルスから再生した植物は草丈が対照系統より低く、プロトプラストから再生した植物はさらに草丈が低かった。一方、苗条数、葉数は、カルスやプロトプラストから再生した植物の系統で非常に多く、特に、P-1 系統が多かった。

### 考 察

本実験では、'八頭'のカルスやプロトプラストから再生した植物体は、全般に対照系統と比較して生育が著しく抑制された。そして、苗条の生長や球茎の形態に異常が認められ、葉が小さく苗条数の多い植物体が多くみられた。しかし、苗条数は、再生個体によりかなりのばらつきがあった。一方、緑色塊状組織 (calloid) から再生した植物は、カルスやプロトプラストから再生した植物に比べて生育抑制の程度が小さく、形態的な異常も少なかった。しかし、緑色塊状組織から再生した4個体のうち2個体が、近縁の'唐芋'に似た形態に変異していた。

組織・細胞培養を経て再生した植物に体細胞突然変異がみられる主な原因として、次のようなことが考えられている。

- 1) 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る。
- 2) 元の植物体に変異した部分が含まれていて、その部分の細胞から元と異なる植物体が再生する。

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、近年多くの植物種について研究がなされている。トウモロコシの体細胞突然変異については研究が進み、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<sup>7,8)</sup>。本実験におい

**Table 3** Shoot growth of plants regenerated from friable calli and protoplasts

Line <sup>a)</sup>	Plant height (cm)	Number of sprouting shoots per plant	Number of leaves per plant
Yatsugashira (original)	51.8a <sup>b)</sup>	1.2 c	3.8 d
C-1	29.0 b	8.9 b	53.5 b
P-1	19.0 c	16.6 a	89.5 a
P-2	13.3 d	7.6 b	29.5 c

<sup>a)</sup> C-1: Plants regenerated from friable calli

P-1 and P-2: Plants regenerated from protoplasts

<sup>b)</sup> Mean separation within each column by Duncan's multiple range test at  $P \leq 0.05$ .

ても、完全に脱分化した組織である柔らかいカルスから再生した植物は、ある程度分化した緑色塊状組織から再生した植物よりも変異の程度が大きかった。体細胞突然変異は、カルスからプロトプラストが単離される過程でも生ずることが考えられるが、本実験の結果では、プロトプラストから再生した植物は、単離前のカルスから再生した植物に比べて変異の程度に明らかな違いはなかった。

元の植物体に変異した部分が含まれていること、すなわち植物のキメラ性により、再生した植物に変異が生じることは、キク<sup>9)</sup>、ゼラニウム<sup>10)</sup>等の植物種の培養について報告されている。サトイモは芽条変異を生じやすいことが知られており、親芋から多くの苗条が伸長する'八頭'の芽条変異で、親芋から1本の苗条しか伸長しない'唐芋'に似た植物が得られたり、逆に'唐芋'の芽条変異で'八頭'に似た植物が得られたことが報告されている<sup>4)</sup>。本実験の結果でも、'八頭'の組織培養により、'八頭'型の植物と、'唐芋'型の植物が再生した。これらの現象は、'八頭'が、'八頭'の性質を持つ組織と、'唐芋'型の性質を持つ組織を併せ持つキメラであることを示唆している。本実験で用いた'八頭'系統がもしそのようなキメラであれば、組織培養で再生した'八頭'型のS 2-1系統は、'八頭'の性質を持つ組織から再生した、いわば完全な'八頭'である可能性がある。

本実験の結果、組織のカルス化の際に大きな体細胞突然変異が起きることが明らかとなった。また、元の植物体に変異した部分が含まれていることが体細胞突然変異に関係している可能性が示唆され、このような変異した部分が含まれていない品種・系統を培養に用いる必要のあることも示された。

## 要 約

サトイモの品種‘八頭’を供試し、カルスおよびプロトプラストから再生した植物の形質を調査した。

無菌植物を暗黒下で培養し伸長させた黄化茎の切片を、 $30 \text{ g} \cdot \text{liter}^{-1}$  ショ糖、 $1 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$  2,4-D +  $1 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$  ip および  $2 \text{ g} \cdot \text{liter}^{-1}$  ジェランガムを添加した MS 培地で培養し、カルスを誘導した。黄化茎切片から形成した組織は、ほとんどが緑色の塊状であったが、一部黄白色の柔らかいカルスも形成された。この黄白色の柔らかいカルスを同組成の培地で継代培養して増殖させた。このカルスを振とう培養して懸濁細胞を作成し、それからプロトプラストを単離した。

緑色塊状組織、カルスおよびプロトプラストを、種々の濃度の NAA と BA を添加した培地で培養し、植物体を再生させた。‘八頭’は、親芋から多くの苗条が伸長する性質を持っているが、緑色塊状組織から再生した植物 4 個体のうち 2 個体は、親芋から 1 本しか苗条が伸長しなかった。カルス由来の再生植物や、カルスから単離したプロトプラスト由来の再生植物は、元の‘八頭’植物に比べて草丈が著しく低く、苗条数、葉数が多かった。

## 文 献

- 1) Kameya, H.: Culture of protoplasts from chimeral plant tissue of nature. Japan J. Genet., **50**, 417-420 (1975)
- 2) Kanda, M., S. Kikuchi, F. Takikawa and K. Oono: Regeneration of variant plants from rice (*Oryza sativa* L.) protoplasts derived from long-term cultures. Japan J. Genet., **63**, 127-136 (1988)
- 3) Kao, K. N. and M. R. Michayluk: Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. Planta (Berl.), **126**, 105-110 (1975)
- 4) 熊沢三郎・二井内清之・本多藤雄: 本邦におけるサトイモの品種分類. 園芸学会雑誌, **25**, 1-10 (1956)
- 5) Murashige, T. and F. Skoog: A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiol.Plant., **15**, 473-497 (1962)
- 6) Nyman, L. P., C. J. Gonzales and J. Arditti: Reversible structural changes associated with callus formation and plantlet development from aseptically cultured shoots of taro (*Colocasia esculenta* var. *antiquorum*). Ann.Bot., **51**, 279-286 (1983)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) 柴田道夫: キクの突然変異育種と組織培養の利用. バイオホルティ, **4**, 23-25 (1991)