

研究ノート

焼酎原料『黄金千貫』の葉片および葉柄を用いた形質転換体 作出に向けたプロトコル確立へのアプローチ

西村佳子¹, 杜 召生², 石井修平¹, 田中佑樹¹, 陳 蘭莊 (庄)^{1,3*}

¹大学院園芸学・食品科学研究科; ²中国河南省農業科学院; ³生物工学研究室

2010年10月20日受付; 2010年12月21日受理

Approach to establishment of plant regeneration and transformation protocol by culture of leaf segments and stalks in "Koganesengan" of Shochu usage

Yoshiko Nishimura¹, Zhaosheng Du², Shuhei Ishii¹, Yuuki Tanaka¹, Lanzhuang Chen^{1,3*}

¹Grad. Sch. Horti. and Food Sci., Minami Kyushu University, 3764-1, Tatenochou, Miyakonojyou city, Miyazaki 885-0035, Japan;

²Institute of Agricultural Biotechnology, Henan Academy of Agricultural Science, Nongye Road,

Zhengzhou, Henan Province, China; ³Laboratory of Biotechnology, Faculty of Environ.

and Horti. Sci., Minami Kyushu University, 3764-1, Tatenochou,

Miyakonojyou city, Miyazaki 885-0035, Japan

Received October 20, 2010; Accepted December 21, 2010

"Koganesengan", one of the most popular cultivars of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) in Minamikyushu region for Shochu usage, was used in this study to establish the protocol of plant regeneration, as an approach of making transformants of *ASG-1* gene isolated from apomictic *Panicum maximum* in our lab., to feel out the abilities of seed propagation. Firstly, we used the methods reported until now and based on those, modified some cultural hormones and components for callus formation. Lismaier and Skoog medium (LS) (1965) (2, 4-dichlorophenoxy acetic acid: 0.5 mg/l, Absciscic acid: 2.0 mg/l, Yeast Extract: 0.3%), LS (Picloram: 1.0 mg/l) and LS (4-fluorophenoxyacetic acid: 1.0 mg/l) gave higher rates of 83.3%, 90.0% and 96.8%, respectively. However, there showed differences in callus formation rates among the used cultivars of "Koganesengan", "Narutokintoki" and "Beniazuma", in used different media. Secondly, for the embryogenic callus formation, adventitious embryogenesis and multi-shoot generation, LS (Picloram: 1.0 mg/l) showed higher rates and, 1/3 length of taking time for adventitious embryogenesis and 1/2 in multi-shoot generation when compared with those in LS (2, 4-dichlorophenoxy acetic acid: 1.0 mg/l). It is the first time that we have reported in this study, to try to establish the protocol of plant regeneration for making transformants of *ASG-1* gene to get seed propagation of sweet potato. Now, the experiments are in progress.

Key words: embryogenic callus, *Ipomoea batatas* (L.), leaf segments, multi-shoot generation, stalk culture

緒言

サツマイモ (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) は、世界において重要な食料作物の1つである。日本では、青森を除く全国で栽培 (H21 農林水産省統計) されており、食料としてはもとより加工用、でん粉原料用として、特に南九州では『芋焼酎』の原料としても広く栽培さ

れている。また南九州はサツマイモの2大産地のひとつに数えられており、宮崎県は全国で4番目の生産量を誇るサツマイモの産地でもある¹⁾。

さらにここ最近では、食品の機能性について消費者の関心が高まっており、サツマイモにおいても抗酸化活性の高い品種の開発や機能性成分についての研究が進み、消費者のニーズに応じた品種が登場してきている²⁾。

このように、サツマイモは重要な食料作物のひとつであるが、その繁殖様式は栄養繁殖であり、原産地の

* 連絡著者

中南米や九州の南の温暖な地域では開花が見られるが、開花しても結実しにくいという特徴をもっている。よって日本における種子採集は、品種改良を主な目的として開花性台木に木立アサガオを用いて行われ、一般的な栽培には種芋から蔓を採取するか、ポット苗を購入する方法が取られている。つまり、収穫した芋すべてを食料にまわすことはできず、種芋を長期保存するための場所の確保が必要となってくる。また、種芋は品種によって保存が難しいものもあり、本研究で用いた『黄金千貫』の貯蔵期間は通常収穫後2~3ヶ月程度である。このことから、サツマイモの種子繁殖については以前より数々の研究が行われており、種子繁殖の可能性を秘めた系統の選抜が行われている³⁾。しかし残念ながらいまだに確立には至っていない。もしも種子繁殖が可能となれば、上述した種芋や種芋の長期保存に関わる費用および労働力はすべて不要となり、計り知れない経済効果が期待される。また全世界で危惧されている食糧難の危機の軽減に十分貢献できるのではないかと考えている。本研究室では、アポミクシス性特異遺伝子*ASG-1*をすでに単離しており⁴⁾、*ASG-1*は種子繁殖の可能性を秘めている⁴⁾。この遺伝子を導入し、植物体を作出できれば、種子繁殖の可能性が広がるのではないかと考えている。

ところで、サツマイモは細胞培養において扱いにく

い作物としてよく知られている。これまで高系14号を中心として茎頂培養、塊根由来、プロトプラスト、葉片培養などが試みられており、植物体作出の例もある^{5-14, 16-18)}。また、形質転換を行った報告もある^{15, 19, 20)}。しかし、南九州で『芋焼酎』の原料として使われ、焼酎の最適品種として位置付けられている『黄金千貫』においては研究例がなく、培養系も確立していない。

先にサツマイモは温暖な地域では開花が見られることを述べたが、『黄金千貫』は、宮崎においても露地で開花が観察されることがあり、本研究室の温室でも12月末から4月にかけて多数の開花が観察されている(図1A)。このことから、南九州では開花しやすいこの品種は、種子繁殖のモデル植物としてより有用であると考えている。

本研究は、その初歩実験として『黄金千貫』を用いた培養系を確立するために、既存手法を基本としてカルス形成率、不定胚・多芽体・不定根形成の有無や形成期間などにおよぼす基本培地、ホルモンの濃度および組み合わせについて比較・検討を行った。供試部位には、茎頂由来カルスを用いている例が多いが、この方法は、ウイルスフリー苗を作出する上で有効であることが知られている一方、顕微鏡を用いて茎頂を摘出する技術の習得に時間がかかること、また茎頂からカルスを形成する期間が2ヶ月程度かかること、一度に

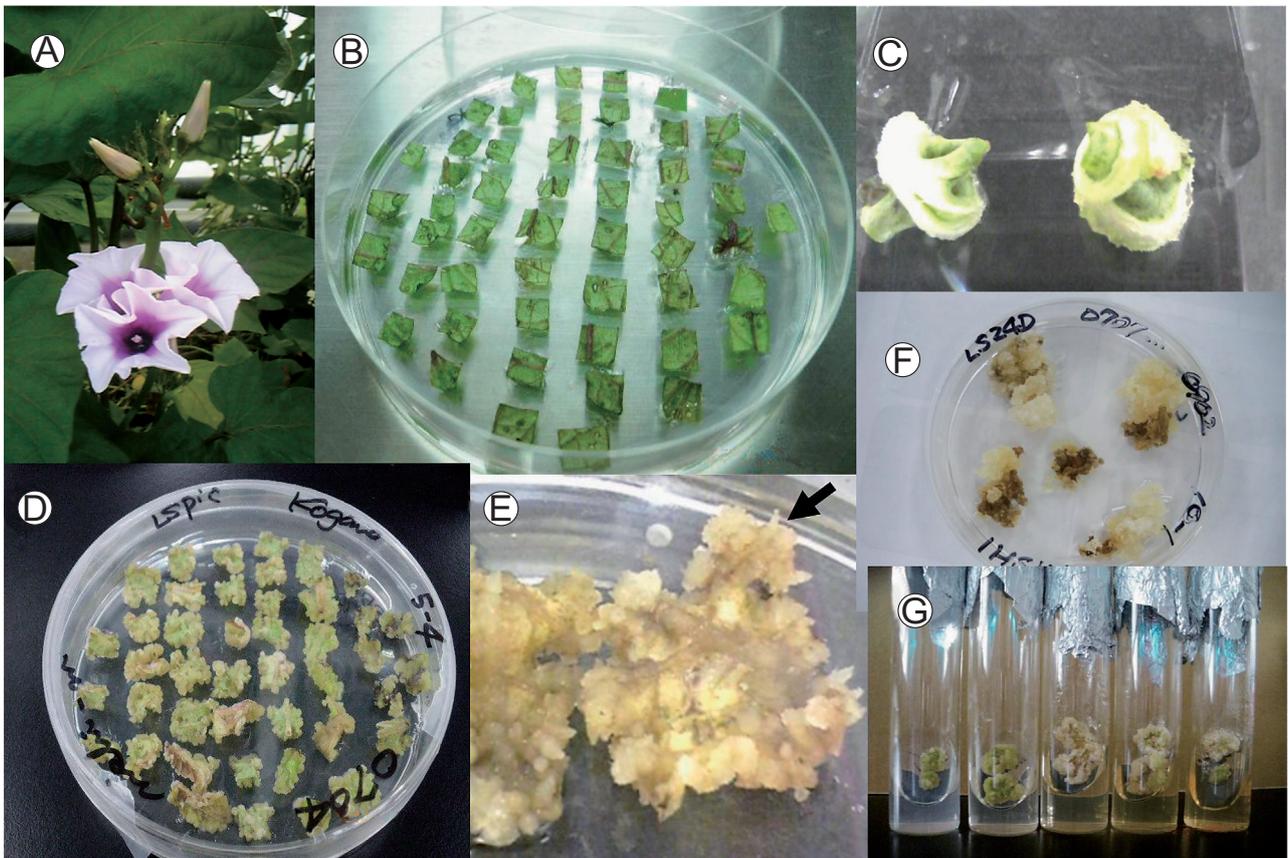


図1. 『黄金千貫』花と葉片培養からのカルスおよび多芽体形成 A) 南九州大学温室内での『黄金千貫』の開花; B) カルス形成に用いた葉片(培養当日); C) Picloram添加系での初期培養3日後の葉片; D) Picloram添加系でのカルス形成; E) 多芽体とグリーン化; F) 2,4-D (1mg/l) 添加系でのカルス形成; G) Yeast Extractの効果(図左から0%, 0.1%, 0.3%, 0.5%, 0.7%のYeast Extractを添加, 写真は培養30日後)。

表1. サツマイモにおけるカルス形成のための各種ホルモンの組み合わせと既存手法

オーキシシン (mg/l)				サイトカイニン (mg/l)		その他 (mg/l)		既存手法の品種	外植体	既存手法
2,4-D	NAA	Picloram	4FA	BA	Kinetin	ABA	Yeast Extract		(大きさ)	(年)
1								-	-	-
1				0.5				-	-	-
0.5						2	3	中国25号	葉片 (10mm)	大谷ら (1996)
LS		1						高系14号 他10種	茎頂 (0.5-0.7mm)	大谷ら (1996)
		1				2	3	-	-	-
			1					高系14号	茎頂 (0.5-0.7mm)	大谷ら (1996)
1				0.5				-	-	-
1	0.01			0.5				宮崎紅	葉片 (5~7×3~5mm)	杜 (2003)
MS	0.01				2			-	-	-
	0.01			0.5				-	-	-
		1						-	-	-
		1				2	3	-	-	-

各培地ともスクロース3%, ゲランガム0.32%, pH5.7~5.8で調整, Yeast Extract添加系のみスクロース5%添加。既存手法以外 (-) は本研究オリジナルの組み合わせ。

大量のサンプルを得るのが難しいなどの点があり、本研究では、コンスタントにサンプルが採集できること、サンプルの採集を茎頂から展開葉1枚目としたことにより、容易にサンプルの統一が図れること、一度に多量のカルスの形成が可能であること、様々なホルモンの組み合わせを行う中でのカルスの観察や選抜が短期間で可能なことなどの利点から供試部位に葉片と葉柄を用い、『黄金千貫』における葉片および葉柄由来カルスから植物体再生のプロトコルの作成を行ったので報告する。

材料および方法

サツマイモ (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) 品種『黄金千貫』を、葉片と葉柄からのEmbryogenic callus (EC) カルス形成におけるオーキシシンの効果を明らかにするために使用し、そのほか全国で最も栽培面積が多い『ベニアズマ』、次に続く『高系14号』の優良系統のひとつである『なると金時』をカルス形成における品種間差異について検証するために対照区として使用した。

上記の供試植物は、南九州大学環境園芸学部の山口健一教授のご好意により種芋を譲り受け、人工気象器内 (30℃, 12時間日長) で萌芽させ、その後、南九州大学構内の温室で栽培した。成長が旺盛な蔓の茎頂から5cm程度を切り取り、殺菌・洗浄 (70%エタノール: 2分, アンチホルミン0.4%: 15分, 滅菌水: 5分×3回) したものをオートクレーブ (121℃・20分) にかけた焼土とバーミュキュライト (体積比7:3) 入りポットに定植し、人工気象器 (28℃16時間日長) で維持した。

茎頂から展開葉1枚目を葉片は約5mm~6mm角に、同じく葉柄部分を2mm~3mmの大きさに切り取り、供試材料とした。(図1B)

既存手法を基本とした『黄金千貫』のカルス形成

LS (Lismaier and Skoog 1965) とMS (Murashige and Skoog 1962) 両培地に3%~5%のスクロース, pH 5.7~5.8に調整し, 0.32%のゲランガムを加えたものを基本培地とした。既存手法2, 4-dichlorophenoxy acetic acid (2, 4-D), 1-naphthylacetic acid (NAA), Picloram, 4-fluorophenoxyacetic acid (4FA) の4種類のオーキシシンとサイトカイニンである6-Benzyladenine (BA), Kinetin の2種類, さらにAbscisic acid (ABA) を組み合わせ (表1), 培養はすべて25℃, 暗黒下で行った。3週間後, カルス形成率 (表2), および品種間差異 (表3) についての調査を行い, 既存手法の検討とカルス形成における最適培地の検討を行った。

異なる培地における不定胚誘導カルスから不定胚形成までの期間

4~8週間後, 上記の培地で形成された不定胚誘導カルスの中から十分にカルスが形成されたものを選抜し, 3%スクロース, 0.32%のゲランガム, 1.0mg/l のGibberellic acid (GA₃) と4.0mg/l のABAを添加したLS培地にカルスを置床し, ECカルスの形成率および不定芽と不定根の形成率 (表4, 5), 多芽体形成までの期間 (表6) について調査を行った。

カルス形成のためのPicloramとYeast Extractの効果

カルス形成のためのPicloramの効果については, MS

基本培地に5%のスクロース, Picloram (0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/l) を加え, ゲランガム0.32%を加えて行った. Yeast Extractの効果については, 同様にMS基本培地を用い, 5%のスクロース, Picloram 1.0 mg/l, ゲランガム0.32%, Yeast Extract (0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7%) を加えて行った. 供試部位はともに葉片を用い, 30日後のカルス形成の生重量を測定した (図2, 3).

結果および考察

既存手法を基本とした『黄金千貫』のカルス形成

サツマイモのカルスは, 培養後10日前後から顕著に

表2. 各種ホルモンによる『黄金千貫』の葉片および葉柄由来のカルス形成率

ホルモンの組み合わせ	葉片		葉柄	
	外植体の数	カルスの形成率 (%)	外植体の数	カルスの形成率 (%)
2,4-D	127	81.0	36	44.4
2,4-D+BA	61	29.5	20	75.0
2,4-D+ABA+Yeast Extract	78	83.3	-	-
Picloram	806	90.0	358	63.6
Picloram+ABA+Yeast Extract	684	62.4	37	70.8
4FA	156	96.8	31	100.0
2,4-D+BA	68	69.1	-	-
2,4-D+NAA+BA	238	44.5	46	45.8
NAA+Kinetin	68	77.9	-	-
NAA+BA	68	48.5	-	-
Picloram	918	70.4	260	70.3
Picloram+ABA+Yeast Extract	75	50.7	19	100.0

形成が始まり, 2週間から3週間でカルス形成のピークを迎えた. 継代培養の期間について, 1週間, 2週間, 3週間, 1ヶ月での調査を行ったところ, 3週間~4週間の間が養分を十分に吸収し, 褐変化も見られず効率が良いことが分かった (データは示していない). この期間に継代培養を行えば, 効率的に培地中の養分を吸収することができると考え, 以後の継代培養を4週間ごとに行った.

既存手法を基本にした培地でのカルス形成には, LSおよびMS両基本培地を用い, LSでは6区分, MSでは5区分でカルス形成率を調査した (表1). 既存手法を用いたLS (2, 4-D: 0.5 mg/l, ABA: 2.0 mg/l, Yeast Extract: 0.3%) では, 葉片で83.3%, LS (Picloram: 1.0 mg/l) では, 90.0%, LS (4FA: 1.0 mg/l) では, 96.8%といずれも高い形成率を示した. 大谷ら⁵⁾は以前に, 『高系14号』でLS (Picloram: 1.0 mg/l) のカルス形成率を93.1±3.7%, LS (4FA: 1 mg/l) は96.7±3.1%, また高系14号を含む11品でもLS (Picloram: 1.0 mg/l) 添加系においていずれも高いカルス形成を示したと報告しており, 『黄金千貫』においても初期カルスの形成においてPicloramが有効であることが確認された. またABAがサイトカイニンを抑制することは知られており, ABAを添加することでカルスから不定胚発生が報告されているが^{5, 6, 10)}, 今回, 『黄金千貫』においてABAを添加した系では, ABAを添加していない系よりもカルス形成率が低くその後の不定胚形成もなかった (表2, 4). しかし, 『なると金時』においては, ABAを添加することでカルスの形成率が低くなるとは言えず, 形成率が100%となった組み合わせもあった (表3). これは, サツマイモに含まれる内在サイトカイニンとオーキシンの量が品種によって違い, そのことが影響を与えてのではないかと考えられる. LSとMS基本培地においては, 総じてLS培地のほうがカルス形成率が高いものとなった. 葉柄では, LS (4FA: 1.0 mg/l), MS (2, 4-D: 0.5 mg/l, ABA: 2.0 mg/l, Yeast Extract: 0.3%) でともに100%のカルス形成率を示した. しかし葉柄は初期のカルス形成 (2週間程度) はよいが, その後急激に褐変化および枯死するものが多く現れ, カルスを

表3. 『黄金千貫』, 『なると金時』, 『ベニアズマ』を用いた各種培地におけるカルス形成率の品種間比較

外植体	培地	ホルモンの組み合わせ	黄金千貫	なると金時	ベニアズマ
			カルスの形成率 (%)	カルスの形成率 (%)	カルスの形成率 (%)
葉片	LS	2,4-D+ABA+Yeast Extract	83.3	100.0	-
		Picloram	90.0	93.8	80.2
		Picloram+ABA+Yeast Extract	62.4	74.9	-
		4FA	96.8	-	45.4
MS	MS	2,4-D+NAA+BA	44.5	-	50.0
		Picloram	70.4	91.4	87.2
		Picloram+ABA+Yeast Extract	50.7	96.3	89.1
葉柄	LS	Picloram	63.6	-	75.0
		Picloram+ABA+Yeast Extract	70.8	63.2	-
MS	MS	Picloram	70.3	89.9	90.7

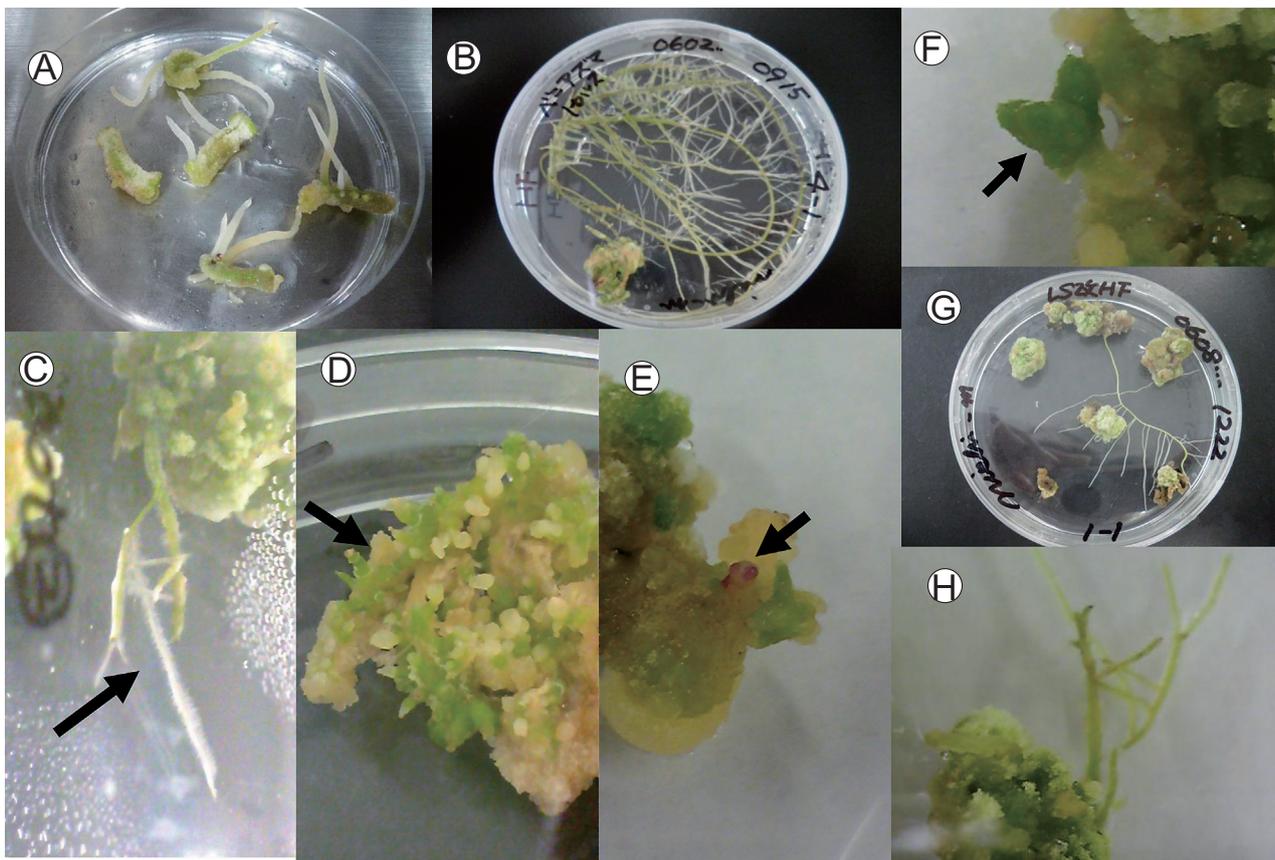


図2. 『ベニアズマ』の初期培養で見られた不定芽，不定根および『黄金千貫』の不定胚から不定芽，不定根までの様子
 A) Picloram (1mg/l) 添加培地でのベニアズマの葉柄; B) ホルモンフリー (HF) 培地でのベニアズマの不定根発達; C) 葉片由来カルスからの根の形成 (矢印は根毛部分); D) 多芽体とグリーン化 (矢印は多芽体); E) 色素の見えるカルス (矢印は色素部分); F) 再分化の様子 (矢印は幼葉体); G) HF培地での葉片からの根の形成; H) 葉柄からの不定芽の形成. 図2C~Hはいずれも『黄金千貫』での形成をあらわす.

表4. 『黄金千貫』の葉片における異なる培地からのECカルス形成率，不定芽及び不定根の形成率

ホルモンの組み合わせ	不定胚誘導率	不定芽形成率	不定根形成率
	(%)	(%)	(%)
2,4-D	97.7	19.6	1.3
2,4-D+BA	72.2	0.0	0.0
2,4-D+ABA+Yeast Extract	63.1	0.0	0.0
LS Picloram	46.6	4.4	2.9
Picloram+ABA+Yeast Extract	71.1	1.4	0.7
4FA	68.2	-	-
2,4-D+BA	0	-	-
2,4-D+NAA+BA	83.3	24.1	1.9
NAA+Kinetin	0.0	-	-
MS NAA+BA	42.4	0.0	0.0
Picloram	63.1	18.4	0.8
Picloram+ABA+Yeast Extract	52.6	0.0	0.0

維持するのが困難であった.

Picloram添加系では，培養開始2~3日後に葉が丸まり始め，それに伴って葉脈部分が顕著に肥大し，その後，葉片の縁沿いにカルスが形成し始めた (図1C, D). またカルス形成初期の段階から多数の芽胞がみられた (図1E). Picloram: 1.0mg/l にYeast Extractを添加した系でもカルスは同じように形成されたが，よりコンパクトで黄色がかかったカルスになった. 2,4-Dのみを加えた培地では，白くて柔らかくもろいカルスになり，1ヶ月を過ぎても旺盛なカルス形成を示した. (図1F).

カルス形成における品種間差異

『黄金千貫』，『なると金時』，『ベニアズマ』の3種における，種々の培地での品種間差異の結果を表3に示す. LS培地において葉片では，LS (2,4-D: 0.5mg/l, ABA: 2.0mg/l, Yeast Extract: 0.3%) で『黄金千貫』が83.3%，『なると金時』100%となり，LS (Picloram: 1mg/l) では，『黄金千貫』90.0%，『なると金時』93.8%，『ベニアズマ』80.2%となった. LS (4FA: 1.0mg/l) では，『黄金千貫』96.8%に対し，『ベニアズマ』は45.4%のカルス形成率であった. MS培地では，MS (Picloram: 1.0mg/l) で『黄金千貫』70.4%，『なると金時』

表5. 『黄金千貫』の葉片における異なる培地からのECカルス形成率、不定芽及び不定根の形成率

ホルモンの組み合わせ	不定胚誘導率	不定芽形成率	不定根形成率
	(%)	(%)	(%)
2,4-D	0	-	-
2,4-D+BA	0.0	-	-
LS Picloram	21.3	0.0	0.0
Picloram + ABA + Yeast Extract	20	0.0	0.0
2,4-D+NAA+BA	9.1	0.0	0.0
MS Picloram	46.5	18.2	0
Picloram + ABA + Yeast Extract	0	-	-

時』91.4%, 『ベニアズマ』87.2%となり, MS (Picloram: 1.0mg/l) ABA: 2.0mg/l, Yeast Extract: 3%)では, 『黄金千貫』50.7%, 『なると金時』96.3%, 『ベニアズマ』89.1%となった. 葉片での培養は, いずれも『なると金時』が高いカルス形成率を示し, 品種間での差異が大きいものでは数値の差が50ポイントにもおよんだ. 葉柄では, MS (Picloram: 1.0mg/l)で『黄金千貫』70.3%, 『なると金時』89.9%, 『ベニアズマ』90.7%となった. よって, 葉柄での培養には『ベニアズマ』が適しており, その適切培地はMS (Picloram: 1.0mg/l)であった. また, 『ベニアズマ』においては, カルス形成をすることなく多数の太い不定芽・不定根が見られた(図2A, B).

以上のことから品種によって適する培地が違うことが分かり, 『黄金千貫』においてはカルス形成率がすべての培地で『なると金時』に比べて低いものとなった. しかし, 今回検討した11種類の培地の中で, Picloramがいずれの品種においても高いカルス形成率を示し, 『黄金千貫』においても最適ホルモンであることが分かった(表3).

異なる培地における不定胚誘導カルスから不定胚形成までの期間

表4は『黄金千貫』の葉片における異なる培地からのECカルス形成率, 不定芽及び不定根の形成率を示したものである. カルス形成から不定胚を誘導するための初期培地では, LS (2,4-D: 1.0mg/l)が97.7%と最も高く, その後の不定芽および不定根形成率もそれぞれ19.6%と1.3%となった. その他ではECカルスから不定芽と不定根を形成した培地はLS (Picloram: 1.0mg/l), LS (Picloram: 1.0mg/l, ABA: 2.0mg/l, Yeast Extract: 0.3%)であった. MS培地では, MS (2,4-D: 0.5mg/l, NAA: 0.01mg/l, BA: 1.0mg/l)がECカルス形成率83.3%, 不定芽形成率24.1%, 不定根形成率1.9%となり, その他の培地ではMS (Picloram: 1.0mg/l)のみ不定芽と不定根の形成が見られた.(図2C~G)

表6. 『黄金千貫』における異なる葉片からの多芽体形成期間の差異

カルス形成培地の種類	初期培養から不定胚誘導までの期間	初期培養から多芽体形成までの期間
LS (2,4-D)	123日	140日
LS (Picloram)	42日	75日
MS (Picloram)	83日	99日
MS (2,4-D・NAA・BA)	63日	132日

葉柄ではいずれもECカルス形成率は低い(0.0-46.5%)ものとなり, さらに不定芽形成はMS (Picloram: 1.0mg/l)のみで, 不定芽形成率は18.2%であった(表5, 図2H).

表6は『黄金千貫』における異なる培地での多芽体形成期間の差異を示したものである. LS (2,4-D: 1.0mg/l)では初期培養から不定胚誘導までの期間が123日であり, その後初期培養から多芽体形成までの期間は140日におよんだ. しかし, LS (Picloram: 1.0mg/l)では不定胚誘導までの期間は2,4-Dの3分の1に短縮され, 多芽体形成期間も2分の1の期間と大幅に短縮されたものになった. また, LS (2,4-D)とMS (Picloram)では2週間で不定胚誘導から多芽体が形成された.(図2H)

以上のことより, 初期カルス形成において高いカルス形成率を示したPicloramが不定胚誘導から多芽体形成率や形成期間においても有効であることが分かった. また今回の調査では, LS (Picloram: 1.0mg/l)がカルス形成および不定胚誘導から多芽体形成までを総合して一番適していたが, その後の不定芽, 不定根の形成には至らず, MS (Picloram: 1.0mg/l)は, カルス形成率は低いものの(LS: 葉片90.0% - 葉柄63.6%, MS: 葉片70.4% - 葉柄70.3%), その後の不定芽(LS: 葉片4.4% - 葉柄0.0%, MS: 葉片18.4% - 葉柄18.2%)・不定根(LS: 葉片2.9% - 葉柄0.0%, MS: 葉片0.8% - 葉柄0.0%)の形成のうち, 不定芽の形成において効果的であったので, 『黄金千貫』におけるMS基本培地でのPicloramの最適濃度をさらに探ることとした.

カルス形成のためのPicloramとYeast Extractの効果

前述の通り, Picloramがカルス形成に有効であり, さらにMS基本培地が不定胚誘導から植物体再生に向けて適した培地であることが示唆されたので, 『黄金千貫』におけるPicloramの最適濃度を探った(図3). MS培地にPicloramを添加すると, Picloram添加(0~1.0mg/l)では効果がさほど見られないが, 2.0mg/lでは生重量は最大になり, 4.0mg/lでは減少に転じた. また2.0mg/lでは柔らかくもろいカルスが形成されたのに対し, 4.0mg/lでは, 硬いコンパクトなカルスが形成された. 大谷ら⁹⁾の行った高系14号でのPicloramの効果では, Picloram: 1mg/lでカルス形成率は最大になり, その後は減少しており, ここでも品種間差異が明らかになった. 次にYeast Extractの効果についても同様に調査を行った(図4). MS基本培地にPicloram: 1.0

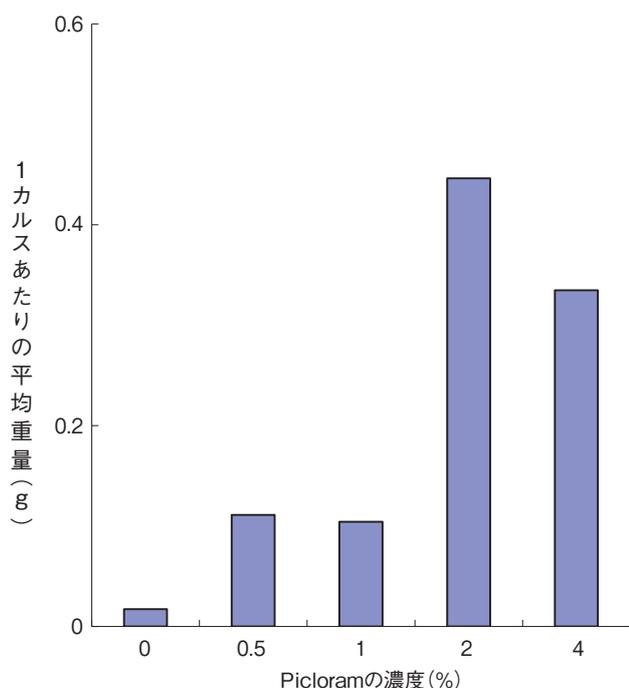


図3. 『黄金千貫』の葉片由来カルス形成におけるPicloramの最適濃度.

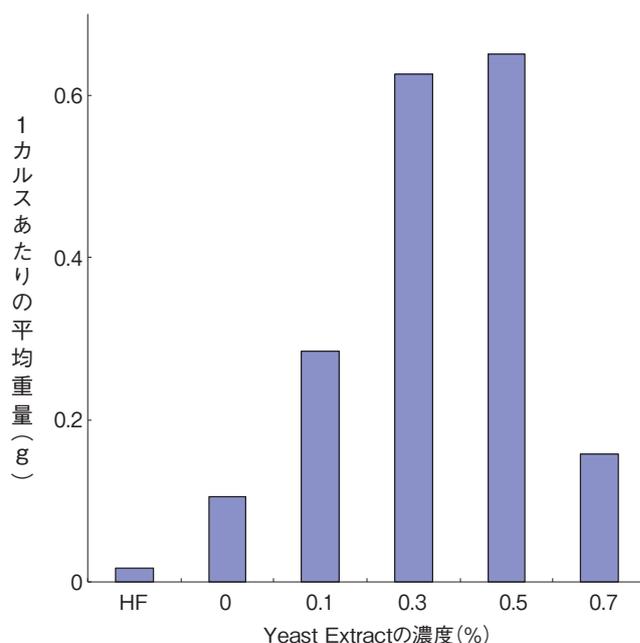


図4. 『黄金千貫』の葉片由来カルス形成に対するYeast Extractの効果.

mg/l を添加した系において、(0~0.7%) の6区分について調査したところ、Yeast Extract: 0.3%で顕著なカルスの増加を示し、0.5%で最大を示した。しかし、0.7%になると、カルスの形成はあまりみられないようになり、コンパクトなカルスの形成が見られるのみであった(図1G)。中島・山口¹³⁾はYeast Extractの効果についてサツマイモにおいては0.3%~0.5%という高濃度のときのみカルスの形成・成長が見られると報告しているが、本研究においても同様の結果が得られた。

上記の結果を踏まえて、本研究での『黄金千貫』培養の最適培地の組成、およびプロトコルを以下のように示す。現在、MS基本培地におけるPicloramとYeast Extractを組合わせた『黄金千貫』の最適培地の検討をさらに行っており、またABAを添加しない不定胚誘導培地についても合わせて検討を行っている。ここではデータを示していないが、ABAを添加せずに、Kinetinを用いることで、わずか5日でグリーンスポットおよび不定芽、不定根の形成が確認されている。また、同時に様々なカルス形成時期におけるアグロバクテリウム法を用いたASG-1の導入も行っており、形質転換にむけてのプロトコルの確立を図っているところである。

本研究での『黄金千貫』における葉片および葉柄由来カルスから植物体再生のプロトコル

1. 外植体の準備

1) 外植体として、茎頂からの展開葉1枚目を用い、水道水で30分程度水洗いする。

2. カルス形成

2) クリーンベンチ内にて、70%エタノールで(1分~2分)表面殺菌と洗浄液の浸透率を高めた後、滅菌水でエタノールを洗い流し、0.4%のアンチホルミンで15分間殺菌を行う(コンタミが発生するようならば、Tween20を40 μl/100mg程度加えると良い)。

3) 滅菌水で各回5分ずつ、計3回洗浄を行い、シャーレ上のろ紙の上で余分な水分を取り除き、葉片を5~6mm四方に、葉柄を2~3mmにカットする。

4) カットした外植体を、MS培地に5%のスクロース、Picloram: 1.0mg/l~2.0mg/lを添加し、pH5.6~5.8(好ましくは5.8)に調整し、ゲランガムもしくはゲルライト0.32%を加えた培地、またはLS基本培地に同様にPicloram: 1.0mg/lを添加した培地で3週間から4週間培養する(25℃, 暗黒下)。

5) 継代培養を4週間ごとに行う。

3. 不定胚誘導

6) 4~8週間後、不定胚が形成されたコンパクトなカルスを選抜し、LS基本培地に3%のスクロース、0.32%のゲランガム、1~2種類のホルモンを組み合わせた培地(例えば、ABA: 4.0mg/lとGA₃: 1.0mg/l)やMS基本培地に5%のスクロース、0.32%のゲランガムとKinetin (1-5mg/l)あるいはGA₃ (1-3mg/l)を加えた培地に置床する。(26℃, 16時間日長)

4. 再分化

7) LS (ABA, Ga₃)では約2週間、MS (Kinetin)では、5-8日で多芽体が出現する。その後、MSホルモンフリー培地に置床し、発根させる。MSホルモンフリー培地は、3%スクロース、0.32%ゲランガムを添加する(26℃, 16時間日長)。

要 約

南九州地方で焼酎の原料として使われる『黄金千貫』を供試して、本研究室で単離したアポミクシス性特異的遺伝子ASG-1を導入し、種子繁殖の可能性をすることを目的として、まず植物体再生のための初歩実験を行った。そこで『黄金千貫』に適した培養系を確立するために、既存手法を基本として諸条件の改変を加えながらカルス形成率、不定胚・多芽体・不定根形成の有無や形成期間などにおよぼす基本培地、ホルモンの濃度およびその組み合わせについて比較・検討を行った。葉片由来のカルス形成においてはLS (2, 4-dichlorophenoxy acetic acid: 0.5 mg/l, Abscisic acid: 2.0 mg/l, Yeast Extract: 0.3%) で83.3%, LS (Picloram: 1.0 mg/l) では90.0%となり、またLS (4-fluorophenoxy acetic acid: 1.0 mg/l) では96.8%といずれも高い形成率を示した。また、『黄金千貫』・『なると金時』・『ベニアズマ』の3品種において、カルス形成率に培地ごとに差があり、品種間にも差異があることが明らかになった。異なる培地における不定胚誘導カルスから不定胚形成までの期間では、LS (Picloram: 1.0 mg/l) は、LS (2, 4-D: 1.0 mg/l) と比べて不定胚誘導期間が3分の1に、多芽体形成までの期間も2分の1に短縮され、初期培養にPicloramを用いることで培養サイクル期間の大幅な短縮が見られた。MS培地での葉片培養におけるPicloramの最適濃度試験では2.0 mg/l で平均生重量が著しく増加し、またYeast Extractの添加試験では0.3%~0.5%の範囲で効果が顕著に見られ、0.7%では逆にカルス生重量が減少した。本研究では、初めて『黄金千貫』に関する植物再生のプロトコルを作成することができた。

謝 辞

本試験において、供試材料を快く提供していただいた南九州大学環境園芸学部環境保全研究室の教授山口健一氏に深く感謝の意を表します。

参考文献

- 1) 農林水産省大臣官房統計部 平成22年2月9日公表 農林水産省統計『平成21年産かんしょの作付面積及び収穫量』P1-P8.
- 2) 吉永優 (2010) 甘しょ品種課題と育種の基本方針等—総括及び九州沖繩農業研究センターにおける甘しょ育種について— 特産育種 (6) 図巻頭1p 8-16.
- 3) 山川理, 坂本敏 (1980) カンショ種子播栽培用品種の育種に関する研究 I. 露地開花性集団における開花結実性種子播適正について育種 *Japan. J. Breed.* **30**: 151-160.
- 4) Chen, L.Z., Miyazaki, C., Kojima, A., Saito, A. and Adachi, T. (1999) Isolation and characterization of a gene expressed during early embryo sac development in apomictic guinea grass (*Panicum maximum*). *Journal of Plant Physiology* **154**: 55-62.
- 5) Otani, M. and Shimada, T. (1996) Efficient embryogenic callus formation in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). *Breeding Science* **46**: 257-260.
- 6) Otani, M., Mii, M. and Shimada, T. (1996) High frequency plant regeneration from leaf calli in sweet potato cv.Chugoku25. *Plant Tissue Culture Letters* **13**: 23-27.
- 7) Liu, Q., Kokubu, T. and Sato, M. (1990) Plant regeneration in stem, petiole and leaf explant cultures of *Ipomoea triloba* L. *Japan. J. Breed* **40**: 321-327.
- 8) Nestor, P. and Kowyama, Y. (1995) Efficient plant regeneration system via embryogenic callus in diploid *Ipomoea trifida* closely related to the sweet potato. *Japanese Breeding Science* **45**: 331-336.
- 9) Nakajima, T. and Kawakami, Y. (1969) Root culture and initiation of adventitious bud in cultured root of sweet potato, *Ipomoea batatas* Poir. *Proceedings of the Crop Science society of Japan XXXVIII*: 454-456.
- 10) 山口俊彦, 中島哲夫 (1972) サツマイモの培養組織における不定芽の形成におよぼすアブサイシン酸の影響 日本作物学会記事 **41**: 531-531.
- 11) 中島哲夫, 山口俊彦 (1968) サツマイモの塊根組織を起源とするカルスの培養条件について 日本作物学会記事 **37**: 247-253.
- 12) 林田英一, 田中正美 液体浸とう培養によるかんしょ多芽体の形成 熊本県農研セ研報 **3**: 1-8.
- 13) 吉永優, 小巻克己 (1993) カンショの葉身及びembryogenic callus由来プロトプラストからのカルス形成及び不定根分化 九州農業試験場報告 **28**: 17-28.
- 14) Murata, T., Fukuoka, H. and Kishimoto, M. (1994) Plant regeneration from mesophyll and cell suspension protoplasts of sweet potato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. *Breeding Science* **44**: 35-40.
- 15) Guo-Qing, S., Honda, H. and Yamaguchi, K. (2004) Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of sweet potato (*Ipomoea Batatas* (L.) Lam.) from stem explants using a two-step kanamycin-hygromycin selection method. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* **40**: 359-365.
- 16) Chen, L. Z., Du, Z. S., Hamaguchi, T., Sugita, T., Nagata, R., Teruo, H. and Tuzuki, E. (2008) Clonal propagation and quick detection of virus-free plant of sweet potato, *Ipomoea batatas*. *Bull. Minamikyushu Univ.* **38A**: 1-5.
- 17) Chen, L.Z., Du, Z.S., Teruo, H. and Tuzuki, E. (2004) Establishment of propagation method in large quanti-

- ties to produce virus-free plants of sweet potato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. by means of culture of shoot apex and sucker. *Bull. Fac. Agri. Univ. Miyazaki* **50**: 1-9.
- 18) Chen, L.Z., Du, Z.S., Nishimura, Y., Hamaguchi, T., Sugita, T., Nagata, R., Terao, H. and Tuzuki, E. (2010) Approach to establishment of plant regeneration and transformation system in sweet potato (*Ipomoea batatas*) by culture of leaf segments. *Bull. Minamikyushu Univ.* **40A**: 59-63.
- 19) Otani, M., Shimada, T., Kimura, T. and Saito, A. (1998) Transgenic plant production from embryogenic callus of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) Using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotechnology* **15**: 11-16.
- 20) Shimada, T. and Otani, M. (2007) IV.3 Sweet Potato Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol. 59 337-353. *Transgenic Crops IV* (ed. by E. C. Pua and M. R. Davey), Springer-Verlag Berlin in Heidelberg.