

接ぎ木法を用いたサツマイモの種子生産と エレクトロポレーションによる種子への直接遺伝子導入

升岡 繁¹, 西村佳子², 高畑康浩³, 陳 蘭庄^{1,2*}

¹南九州大学大学院園芸学・食品科学研究科; ²生物工学研究室;
³九州沖縄農業研究センター畑作研究領域サツマイモ育種グループ

2015年10月1日受付; 2016年2月1日受理

Approach to seed production of sweet potato (*Ipomoea batatas*) using grafting method and establishment of direct gene transformation to sweet potato seeds using electroporation method

Shigeru Masuoka¹, Yoshiko Nishimura², Yasuhiro Takahata³, Lanzhuang Chen^{1,2*}

¹Grad. Sch. Horti. And Food Sci., Minami Kyushu University; ²Lab. Biotech. Fac. Environ. And Horti. Sci., Minami Kyushu University; 3764-1, Tatenochō, Miyakonojo-shi, Miyazaki, 885-0035, Japan; ³Kyushu-Okinawa Agricultural Research Center, Miyakonojo, Miyazaki, 885-0091, Japan

Received October 1, 2015; Accepted February 1, 2016

Apomixis, an unsexual reproductive mode, bypasses meiosis to produce seed. And it is considered to bring economic benefits over than the “Green Revolution” by using to fixation of F₁ variety in agriculture. In our laboratory, we have been successful in cloning the apomixis-specific gene of *ASG-1*, isolated from *Panicum maximum*. In order to do functional analysis of the *ASG-1*, we have been carrying out the gene transformation of *ASG-1* in sweet potato, a vegetative reproductive crop. In this study, the purpose is getting transformants by using the seeds of sweet potato and the instrument of NEP21, an electroporation. As the first step, we used the *Ipomoea nil* cv. [Kitachiasagao] as stock and *Ipomoea batatas* (L.) cv. [Koganesengan], [Narutokintoki] and [Beniazuma] as graft to get seeds. And then, the transformants of GUS was induced into sweet potato seeds by using the instrument of NEP21. As the results, 1) according to the standard of selecting variety based on the cross incompatibility referred from Kyushu-Okinawa Agricultural Research Center, we selected 3 varieties out from 6 ones held; 2) according to the standard of selection suitable to be used as either seed side or pollen side, we have gotten matured seeds successfully from the 3 varieties; 3) using the sweet potato seeds collected and the instrument of NEP21, GUS gene expression was detected in the transformant by GUS dyeing with blue color appeared on the surface of the seeds and young buds. Now, the experiment of *ASG-1* transformation is going on.

Key words: direct gene transformation, electroporation, grafting method, seed production, sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.))

緒 言

サツマイモはヒルガオ科 (*Convolvulaceae*) サツマイモ属 (*Ipomoea*) に属する栄養繁殖作物で、学名は *Ipomoea batatas* (L.) Lam. である。サツマイモの起源

はメキシコからペルーに至る中南米となっており、そこから世界各地に伝播していった。起源地からどのような経路で伝播したかはっきりしていないが、サツマイモの呼称、航海記録、民族学的伝承などから推察するには、複数の経路を経て、南太平洋、ヨーロッパ、アジア、アフリカへと広がったと考えられている。そして日本には1600年代以降、中国や沖縄などから様々な経路を経て導入され、救荒作物として極めて重要な

*連絡著者: E-mail, lzchen@nankyudai.ac.jp

役割を果たしてきた。また日本では年間 100 万トン程度の収穫があり、南九州だけで全国の収穫量の約 5 割を占めている。その用途として、青果用、菓子等の加工食品用、デンプン用、焼酎用など幅広い用途で使われる重要な作物となっている。

サツマイモは他殖による種子繁殖と、蔓先や芋などを用いる栄養繁殖のいずれも可能であるが、6 倍体で他殖性、さらに交配不和合群の存在といった特性を持っているために遺伝子構造が複雑で後代の表現型がきわめて多様である。また中南米や九州の南の温暖な地域では開花がみられるが結実しにくく、種子繁殖による実用栽培が困難であるため、通常は蔓先を用いた栄養繁殖を行う。しかしこの場合には、芋蔓を作る上での種芋の保存が必要になるため可販売量もしくは販売収量が減り、さらに保存場所の確保や各品種に合った方法で保存する必要があるため、生産過程でのコスト面が問題になっている (Chen et al. 2008)。

そこで、本研究室でイネ科暖地型牧草ギニアグラスから得られているアポミクシス性特異的遺伝子 *ASG-1* (Chen et al. 1999, 2005) をサツマイモに遺伝子導入することにより、アポミクシス性種子 (母親のクローン) を作出し、栄養繁殖から種子繁殖への転換をはかることを目標としている。アポミクシス性種子を作出することが出来れば、従来とは異なって種芋が不要となり、収量増加に繋がるだけでなく、現在の栽培体系で必要不可欠な種芋の保存施設およびエアコン用設備・萌芽による費用も省くことができ、「緑の革命」以上の経済効果が期待される。

これまでにサツマイモの遺伝子組み換え実験は主に器官の組織培養技術を使って、アグロバクテリウム感染を介して行われてきた (Ootani et al, 1996; 西村, 2010)。しかし、成功事例が限られていて、再現性が低

いことが問題である。最近、ネッパジーン社 (日本) が独自に開発したエレクトロポレーション装置により成熟した種子への直接遺伝子導入実験に成功した (西村ら, 2015)。

本研究では、上記のエレクトロポレーション装置を用いたサツマイモ種子への遺伝子導入を行うため、まずコダチアサガオを用いたサツマイモとの接ぎ木を行い、サツマイモ品種の「コガネセンガン」、「ナルトキントキ」、「ベニアズマ」を掛け合わせ、獲得した種子にレポーター遺伝子である GUS を導入する実験を実施したので報告する。

材料及び方法

・実験材料

九州沖縄農業研究センターから分譲されたコダチアサガオ (*Ipomoea crassicaulis*) を台木に、本研究室で育成しているサツマイモ (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) 品種である「コガネセンガン」、「ナルトキントキ」、「ベニアズマ」を穂木として使用した。実験は南九州大学環境園芸学科生物工学研究室の人工気象器の中で行った。

・コダチアサガオの育成

爪切りやカッターを用いて種子の上部に白い部分が少し出るまで傷をつけ、一晩水に浸透した。浸透したジフィーポット (天然素材) に培土 (黒土: ボラ土: 牛糞堆肥 = 4:5:1) を入れ深さ 2cm で 1 粒ずつ播種した (図 1)。

ジフィーポットに播いた種子から本葉が 4 枚出てきたら、直径 10cm のポットに移し替えた。使用した培土は上記と同じものを使用し、マグアンプを各ポット



図 1. 台木用コダチアサガオの播種および育苗過程

A: 充実した種子, B: 種子への傷つけ処理, C: 種子の浸水処理, D: 種子処理後の検査, E: 種子の 1 粒蒔き, F: 苗の鉢上げ

に5gずつ加えジフィーポットの縁が土に隠れるまで土を入れた。ジフィーポットの横に支柱を立て、クリップを使い、コダチアサガオが真っ直ぐ伸びるように誘引した。誘引後は、花芽形成を抑制するために腋芽をすべて除去し、草丈が約40cmに達した後に接ぎ木に用いた。

・交配用品種・系統の特性判定

表1に九州沖縄農業研究センター都城研究拠点サツマイモ育種グループが過去の交配実験結果に基づいて、作成した交配特性判定基準を示す。本研究では、同基準をもとに6品種・系統について、交雑不和合性の検定と品種間交配可能性を判定した(表2)。その結果、種子が得られる可能性のある品種・系統として「鳴門金時＝ナルトキントキ」、「黄金千貫＝コガネセンガン」、「ベニアズマ」だけを選定した。

・サツマイモとの接ぎ木

「ナルトキントキ」、「コガネセンガン」、「ベニアズマ」の3品種を用いて接ぎ木を行った。腋芽が多い蔓を使用すると花が咲く部位が増加するため、採取できる種子の数が増える。またサツマイモの蔓を接ぎ木する場合に使用する芋の蔓全体を水に浸しておき、乾燥させないようにした。

コダチアサガオを地上から約20cm(葉約12枚程度残す)の位置でカッターを用いて切断し、サツマイモを

穂木として割り接ぎを行った(図3,4)。その後ビニール袋などで1週間覆い被し(湿度を上げ)、接ぎ木部分の癒着を促進した。袋をかけている間にも必要に応じて適宜かん水を行った。

接ぎ木1週間後に袋を除去した後、台木の部分にある腋芽・枯葉を除去した。その後、結合部分が外れないように注意しながら誘引クリップを外し、支柱を1本から3本に増やし、支柱に蔓を巻き付けていく(図5)。

今回は、接ぎ木した個数が少なかった為、研究室室内にある蛍光灯下で生育させ、日照時間を16時間(6時～22時)、生育温度を25℃とした。

・交配実験

開花開始後は、午前10時までに交配を行った。

・種子採種

種子を採集する途中でコダチアサガオが枯れた場合にはサツマイモの基部を水につけて種子の採集を行った。種子成熟期(柱頭部分に触れ、折れる時期)に採種を行った(図6)。

・サツマイモ種子への遺伝子導入実験

図1Bのように、サツマイモの種子にナイフで切り込みを入れて発芽を促進させ、水を含ませたろ紙の上に数日間置床して人工気象器内で催芽をした。発芽し

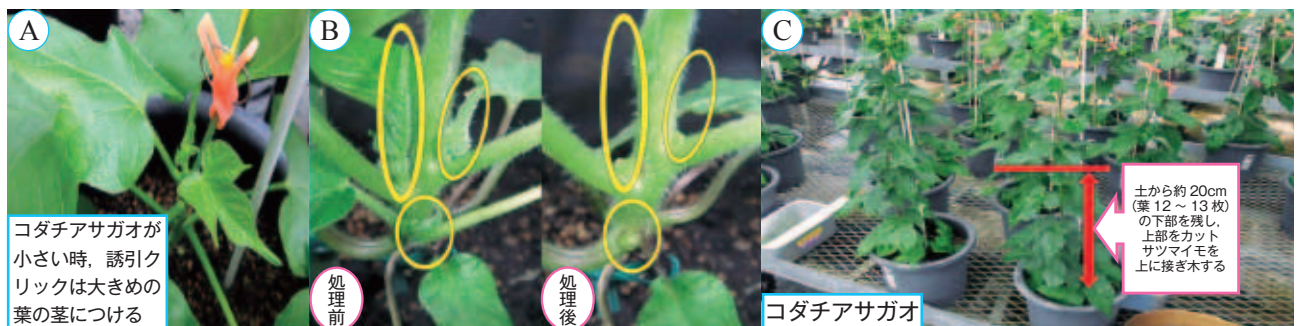


図2. 台木用コダチアサガオの前処理

A: 接ぎ木用の茎をクリップでマークする, B: 腋芽の除去, C: 台木は草丈20cm以上になった後に接ぎ木を行う。

表1. サツマイモ品種・系統の交配特性判定基準(九州沖縄農業研究センターの交配結果に基づく)

A (開花, 母親で判定)		B (稔性, 母親で判定)		C (花粉, 父親にした場合の稔実率で判定)		D (また, 新しい材料は不和合性検定時の花粉量を参考とする)	
1鉢当たり開花数で判定		稔実率で判定		稔実率で判定			
10花未満	x	2%未満	x	2%未満	x	無	x
10花～20花未満	▲	2%～5%未満	▲	2%～5%未満	▲	小	△
20花～40花未満	△	5%～10%未満	△	5%～10%未満	△	中(不和合群 A,C,E)	○
40花～70花未満	○	10%～20%未満	○	10%～20%未満	○	(多不和合群 B,D)	◎
70花以上	◎	20%以上	◎	20%以上	◎		

注: Bには, 交配計画鉢数に余裕がある場合, 組合せ鉢数を増やす分は稔実の良いものを増やす(開花数には関係なく稔実優先)。

D. 花粉が悪いものは父親にしない。必ず父親から外すこと。

表2. 2015 年度接ぎ木法による種子生産用サツマイモ品種の不和合性検定と品種間交配可能性
(九州沖縄農業研究センターのデータに基づく)

交配目的	試供苗			不和合性検定		履歴	交配採種関連特性			備考
	番号	品種・系統名	不和合群	今年	過去	旧系統名	開花	稔実	花粉	
種子生産	N1	シモン	(E)				×			シモン 1 号 別資料より
種子生産	N2	ホワイトスター	B				多			
種子生産	N3	元気	A				○	×	△	高系 14 号
種子生産	N4	コガネセンガン	B			九州 55 号, C95-2	○	◎	◎	
種子生産	N5	鳴門金時	(E)				▲	○	○	
種子生産	N6	ベニアズマ	A	1982		関東 91 号, 千系 13	○	△	○	
種子生産	N7	べにまさり	Bf	1997		九州 130 号, 九系 191	△	△	△	
注： 開花・稔実・ 花粉状況 (判定の詳細は表 1 参照)	N1	シモン	(E)	(E) の不和合群はシモン 1 号の参考データ 不和合群検定, 交配データなし						
	N2	ホワイトスター								
	N3	元気	A							
	N4	コガネセンガン	B							
	N5	鳴門金時	(E)	(E) の不和合群は高系 14 号の参考データ						
	N6	ベニアズマ	A							
	N7	べにまさり	Bf							
	N1	シモン	(E)	開花は少なめ						
	N2	ホワイトスター								
	N3	元気	A	花粉不良, 受粉率も低下						
	N4	コガネセンガン	B							
	N5	鳴門金時	(E)	開花は少なめ						
	N6	ベニアズマ	A	花粉はいいが, 受粉率は低下する						
	N7	べにまさり	Bf	不和合群 (Bf) は同じ (B) 群の場合, 相手に受粉は可能である 開花数, 花粉はあまり良くない						

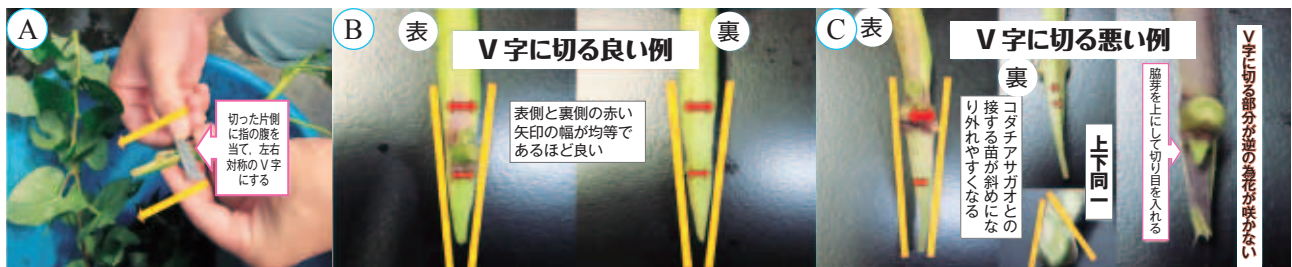


図 3. 穂木用サツマイモの茎の切り方

A: サツマイモ蔓を穂木にする, B: 切り取った良い穂木, C: 切り取った良くない穂木.



図 4. コダチアサガオとサツマイモとの接ぎ木作製過程

A: 穂木用サツマイモの作製, B: 台木用コダチアサガオの作製, C: 台木と穂木との接ぎ木法による嵌め込む.



図 5. 接ぎ木作業およびその後の栽培・管理過程

A: 接ぎ木後、保湿のため鉢ごとにビニール袋をかける, B: 1週間後袋を鉢から外す, C: 接ぎ木部分が癒着している, D: その後、活着して正常な管理をする。

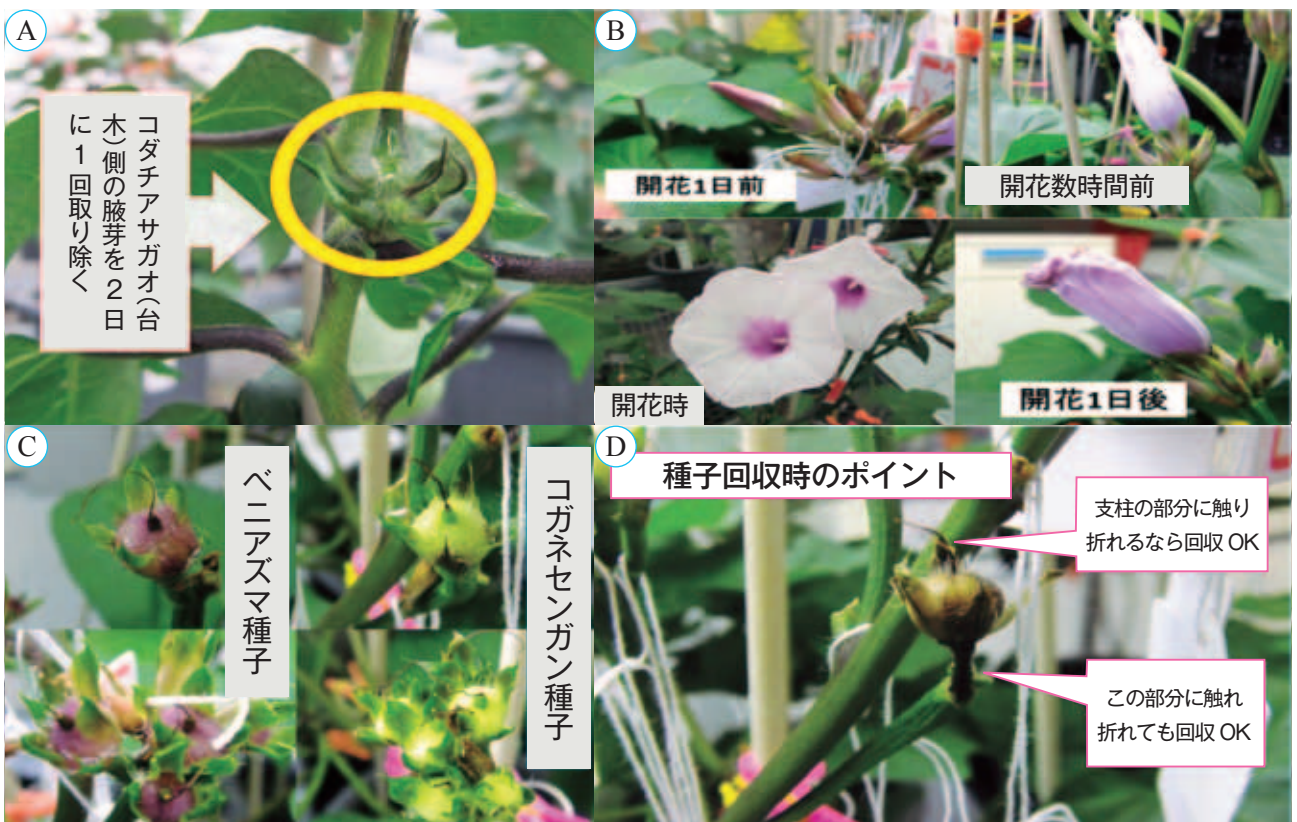


図 6. 接ぎ木したサツマイモの開花、受粉、種子形成および種子収穫

A: サツマイモの生殖成長を保つため、コダチアサガオの腋芽を取る, B: 開花1日前に受粉を行う, C: 受粉後の結実, D: 種子の収穫。

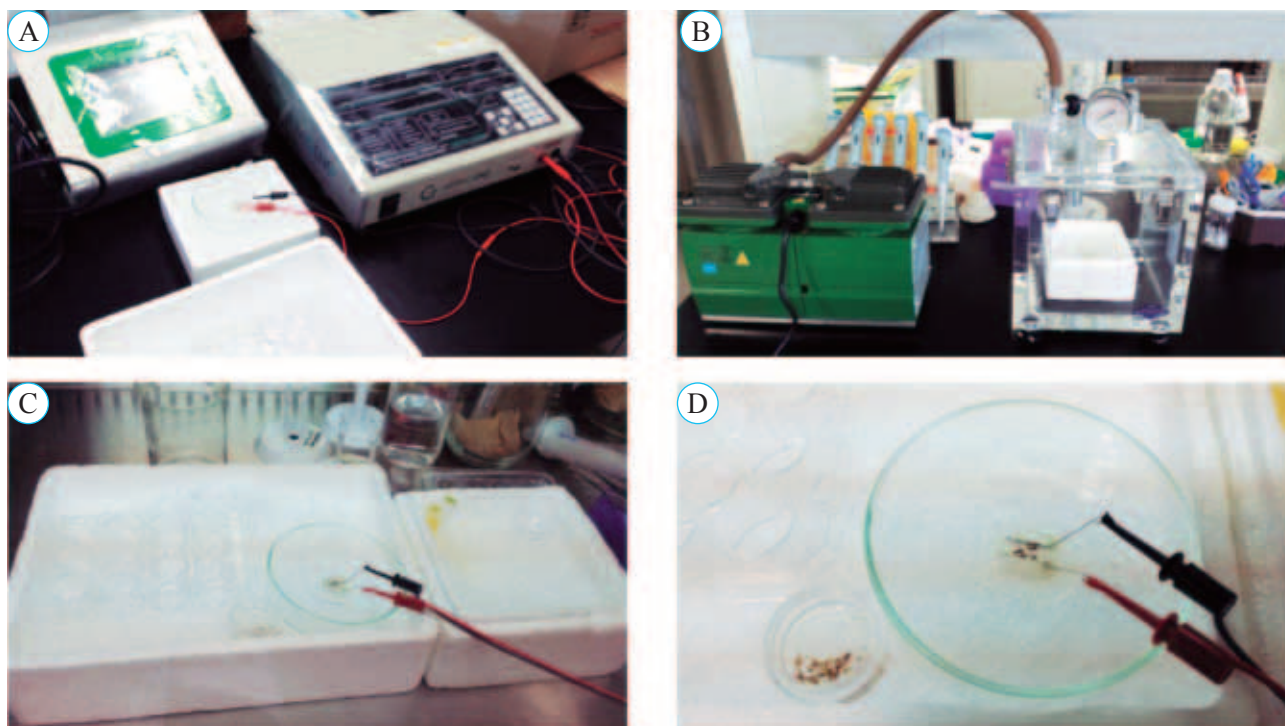


図 7. 本研究で使したサツマイモの種子に直接遺伝子導入する装置

A: NEP21 (左: 超音波装置; 右: エレクトロポレーション), B: 真空ポンプ, C と D: エレクトロポレーション実験の様子.

表 3. 接ぎ木したサツマイモ品種の組み合わせごとの結実率

交配の組み合わせ	交配数(A)	結実数(B)	B/A(%)	種子数(C)	C/A	C/B
ベニアズマ×コガネセンガン	137	63	46.1	100	0.7	1.6
ベニアズマ×ナルトキントキ	36	23	63.9	32	0.9	1.4
ナルトキントキ×コガネセンガン	7	2	28.6	2	0.2	1.0
ナルトキントキ×ベニアズマ	5	0	0.0	0	0.0	0.0
コガネセンガン×ベニアズマ	85	51	60.0	82	0.9	1.6
コガネセンガン×ナルトキントキ	21	11	52.4	26	1.2	2.4

* B/A(%): 結実率, C/A: 1 交配花あたりの種子数, C/B: 1 果実あたりの種子数.

始めたものと、本葉が展開したものを供試し、ネッパジーン社提供のマニュアルに記載されている Buffer 液に pWI-GUS プラスミド DNA および pWI-H5K を添加した液に浸し、プラスチック容器で超音波処理および減圧を行った後、ネッパジーン社製スーパーエレクトロポレーター NEP21 (図 7) を用いてエレクトロポレーションを行った。25℃、暗黒下に 2 日間静置した後、GUS 染色液で染色を行った。

結果及び考察

・交雑和合性によるサツマイモ品種の選別

表 1 と表 2 に示したように、栽培品種の間にも高い自家または他家不和合性が存在することが分かる。本

研究では、九州沖縄農業研究センターの判断基準に照らして 6 つの品種・系統の中から 3 つの品種を選定した。

・花粉親と種子親の選別による種子結実

今回接ぎ木で使したサツマイモの品種のうち、ナルトキントキはコガネセンガン・ベニアズマと比べ開花数は多かったが、花粉の量は大幅に少なかった。ナルトキントキを花粉親とした場合には、一定量の種子を獲得できたが、種子親とした場合には、花粉親がベニアズマでは種子形成が確認できず、また花粉親がコガネセンガンの場合においても、得られた種子は少量であった (表 3)。

ベニアズマの接ぎ木個体では、開花数・花粉量共に多かった。ベニアズマを種子親に用いた場合は、種子形成



図 8. エレクトロポレーションにより, GUS 遺伝子が直接導入されたサツマイモの種子での GUS 染色反応

A: バッファー液に浸したサツマイモの発芽した種子と幼苗が徐々に染色された, B と C: 黒くて青い色が帯びた GUS 遺伝子の発現がサツマイモの種子と幼苗で見られた.

が確認されたが, 花粉親に用いた場合には, 種子親がコガネセンガンの場合にのみ種子が得られた (表 3).

コガネセンガンの接ぎ木個体では開花数・花粉量共に多く, ナルトキントキやベニアズマとのすべての交雑で種子形成が確認された (表 3).

今回の実験では, 正逆交雑によって種子生産を目的とした実験で, それぞれコガネセンガン・ベニアズマ・ナルトキントキの種子を獲得できた (表 3).

・種子への直接遺伝子導入実験

エレクトロポレーションによる種子への直接遺伝子導入を行い, 遺伝子導入の有無について GUS 染色を行ったところ, 施したすべての条件下で GUS 染色が認められた (図 8). 特に今回は初めてサツマイモの種子および幼苗を用いたが, いずれも GUS の発現が認められた. さらに GUS 発現が認められた条件下で pWI-H5K を用いてジェネティシンによる植物体作出のための選抜を行っているところである.

これまでにアグロバクテリウム法によるサツマイモへの遺伝子導入の検討を行ってきたが, 今回新たにエレクトロポレーションによる種子への直接遺伝子導入について検討を行った結果, サツマイモの種子および葉苗で GUS 発現が認められた. 以上の結果, 「木立アサガオ」とサツマイモとの接ぎ木法による種子生産が可能となり, エレクトロポレーションによる種子への直接遺伝子導入実験も成功したことで, 今後, *ASG-1* を用いたサツマイモの組み換え実験の成功が期待される.

要 約

アポミクシスは母親の遺伝子型だけが子供に伝わる生殖である. この形質を実用すれば, 一代雑種の固定や栄養繁殖性植物の種子繁殖性植物への転換が可能になるなど, 「緑の革命」以上の経済効果が期待される. 本研究室では, アポミクシス性ギニアグラスからアポミクシス性特異的遺伝子 (*ASG-1*) をクローニングしている. *ASG-1* の機能解析を行うため, 栄養繁殖性植物のサツマイモへの遺伝子導入実験を実施してい

る. 本研究では, サツマイモの遺伝子導入実験をネッパジーン社の装置を用いて, 種子を使って行うことを目標としているが, 最初の取り組みとしてまず, コダチアサガオを用いたサツマイモとの接ぎ木を行い, サツマイモ品種の「コガネセンガン」, 「ナルトキントキ」, 「ベニアズマ」を掛け合わせ, 獲得した種子にレポーター遺伝子である GUS を導入する実験を実施した. その結果, 1) 交雑和合性によるサツマイモ品種の選別: 九州沖縄農業研究センターの判断基準に照らして 6 つの品種・系統の中から 3 つの品種を選定することができた. 2) 花粉親と種子親の選別による種子結実: 今回接ぎ木で使用したサツマイモの 3 品種について, 正逆交雑によって種子生産を目的とした実験で, それぞれコガネセンガン・ベニアズマ・ナルトキントキの種子を獲得できた. 3) 種子への直接遺伝子導入実験: エレクトロポレーションによる種子への直接遺伝子導入を行い, 遺伝子導入の有無について GUS 染色を行ったところ, 施したすべての条件下で, 初めてサツマイモの種子および幼苗を用いたが, いずれも GUS の発現が認められた. 今後は GUS 発現が認められた条件下で pWI-H5K を用いてジェネティシンによる植物体作出のための選抜を行っているところである.

謝 辞

本試験において, 接ぎ木法の伝授を賜りました九州沖縄農業研究センター福重伸隆氏に深く感謝の意を表します. なお本研究の一部は科研費 23380009 によるものである (LZC).

引用文献

- 1) 財団法人いも類振興会 (2010) サツマイモ事典 全国農村教育協会
- 2) 西村 佳子 (2010) 修士論文 アポミクシス性特

- 異的遺伝子 *ASG-1* の機能解析 –サツマイモ『コガネセンガン』を中心とした組換え植物作出に向けての試み–
- 3) Otani M., Mii M., Shimada T. (1996) High Frequency Plant Regeneration from Leaf Calli in Sweet Potato cv. Chugoku25. *Plant Tissue Culture Letters* 13: 23: -27.
 - 4) Chen, L. Z., C. Miyazaki, A. Kojima, A. Saito and T. Adachi. (1999) Isolation and characterization of a gene expressed during early embryo sac development in apomictic guineagrass (*Panicum maximum*). *Journal of Plant Physiology*, **154**: 55-62.
 - 5) Chen, L.Z., L. M. Guan, M. K. Seo, F. Hoffmann and T. Adachi. (2005) Developmental expression of *ASG-1* during gametogenesis in apomictic guinea grass (*Panicum maximum*). *Journal of Plant Physiology*, **162**: 1141-1148.
 - 6) 西村佳子, 梅木一馬, 張君, 徐成体, 陳蘭庄 (2015) アポミクシス性特異的遺伝子の機能解析 –ギニアグラスの完熟種子由来カルスを用いた植物体再生系の確立–. 南九州大学研報 **45A**: 9-15.
 - 7) Chen, L. Z., Du ZS., Hamaguchi, T., Sugita, T., Nagata R., Terao, H., Tsuzuki, E. (2008) Clonal propagation and quick detection of virus-free plants of sweet potato, *Ipomoea batatas*. *Bull. Minamikyushu U.* **38**: 1-5.
 - 8) Chen, L. Z., Du ZS., Nishimura, Y., Hamaguchi, T., Sugita, T., Nagata, R., Terao, H., Tsuzuki, E. (2010) Approach to establishment of plant regeneration and transformation system in sweet potato (*Ipomoea batatas*) by culture of leaf segments. *Bull. Minamikyushu U.* **40**: 59-63.
 - 9) 西村佳子, 吉田薫, 杉田亘, 陳蘭庄 (2015) アポミクシス性特異的遺伝子の機能解析 –ギニアグラスの種子を用いた *ASG-1* 組換え体作出へのアプローチ. 育種学研究 17 (別 1), 177.