

サトイモ塊茎からのカルス形成と個体再生及び *In vitro* クローン増殖

古谷政道

東北農業試験場作物開発部
(〒996 新庄市十日町)

(1996年2月13日受付)

(1996年5月9日受理)

サトイモは一般にわが国の自然条件下では開花・結実しない。また多くの品種は3倍体であることから、現在まで優良個体の選抜以外に積極的な育種は行われていない¹⁾。従って培養変異や体細胞雑種の利用、あるいは外来遺伝子を導入した形質転換体による品種改良などが考えられるが、そのためには効率的なカルス培養や再分化系の確立が必要である。サトイモにおけるカルス培養に関する研究は比較的新しく、頂芽や腋芽の茎頂培養が一般的で²⁻⁷⁾、一部黄化茎の培養⁸⁾も行われている。本報告では、品種改良のためのより効率的な再分化系開発の一環として、茎頂と比較すると取扱いが容易な塊茎の内部組織を外植体としたカルス形成と個体再生並びに *in vitro* クローン増殖について報告する。

供試品種は「土垂」である。塊茎は流水で洗浄し、表皮を剥いた後に、70%アルコールに10秒、次いで20%アンチホルミン(有効塩素濃度5%)に10分間浸漬し、滅菌した。滅菌水で3回洗浄後、髓の部分を経径5mm

のコルクボーラーで抜き取り、2mmの厚さに切り、外植体とした。

カルス誘導用培地は Murashige and Skoog(MS)培地⁹⁾に植物生長調節物質(ホルモン)、30 g/l ショ糖及び8 g/l 寒天を加えたものを用いた。pHは5.7とした。ホルモンの添加量はベンジルアミノプリン(BA)の濃度を6段階(1, 2, 3, 5, 7, 9 mg/l)、ナフタレン酢酸(NAA)の濃度を7段階(1, 2, 3, 5, 7, 9, 11 mg/l)とする42種類の組合せとした。100 mlの培養瓶に入れた20 mlのカルス誘導用培地に2個の外植体を置床し、遮光した26°Cのインキュベーターで130日間培養した。個体再生用培地は、ホルモンを除いたカルス誘導用培地と同一である。100 mlの培養瓶に20 mlの再生用培地を入れ、形成したカルスを1ないし2個置床し、26°C、16時間照明下でおよそ30日間培養した。なお、形成された淡黄色の柔らかいカルス(Yカルス)は、およそ3mm角の大きさに切り分け、白色の硬いカルス(Wカルス)はそ

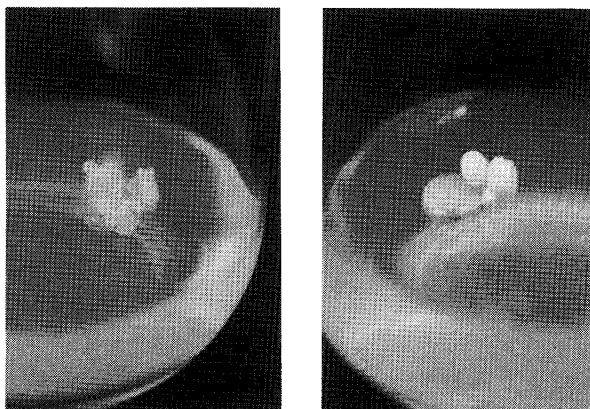


Fig. 1 Yellowish, friable callus(left) and whitish, compact callus(right) were induced from tuber explants of taro cv. Dodare.

Table 1. Callus formation and plant regeneration from tuber explants of taro cv. Dodare.

Concentration of phytohormones (mg/l)* ¹		No. of explants cultured (A)	No. of explants forming callus* ²		No. of explants with plant regeneration* ³ (B)	Percentage of plant regeneration (B/A)
BA	NAA		(Y)	(W)		
2.0	1.0	20	0	0	0	0
	2.0	20	5	1	0	0
	3.0	20	7	1	0	0
	5.0	20	9	1	0	0
	7.0	20	13	1	0	0
	9.0	20	12	1	2(Y)	10
	11.0	20	9	1	0	0
5.0	1.0	20	2	0	0	0
	2.0	20	0	1	0	0
	3.0	20	0	0	0	0
	5.0	20	0	0	0	0
	7.0	20	0	0	0	0
	9.0	20	0	1	0	0
	11.0	20	0	0	0	0
7.0	1.0	20	0	4	0	0
	2.0	20	1	9	9(W)	45
	3.0	20	0	6	4(W)	20
	5.0	20	0	2	2(W)	10
	7.0	20	0	4	1(W)	5
	9.0	20	0	0	0	0
	11.0	20	0	1	0	0
9.0	1.0	20	0	4	0	0
	2.0	20	0	2	2(W)	10
	3.0	20	0	1	1(W)	5
	5.0	20	0	2	1(W)	5
	7.0	20	0	1	0	0
	9.0	20	0	0	0	0
	11.0	20	0	0	0	0

*¹ BA: 6-benzylaminopurine. NAA: α -naphthaleneacetic acid.

*² Callus was induced on MS medium supplemented with BA, NAA, 30 g/l sucrose and 8 g/l agar for 130 days at 26°C under dark. Y: Yellowish callus. W: Whitish callus.

*³ Plants were regenerated from calli on MS medium supplemented with 30 g/l sucrose and 8 g/l agar for 30 days at 26°C with a 16-hour photoperiod.

のまま植え付けた。in vitro におけるクローン増殖には、材料として 7.0 mg/l BA と 2.0 mg/l NAA 添加カルス誘導用培地及び 7.0 mg/l BA と 3.0 mg/l NAA 添加カルス誘導用培地において形成した W カルスから再生した各 1 個体を用いた。増殖は供試個体の草丈がおよそ 1 cm の大きさに生育した時点で、ピンセットによりシュートを株分けし、26°C、16 時間照明下で培養した。

塊茎の髄部を外植体として培養すると、ホルモン濃度の違いにより、外観が明らかに異なる 2 種類のカルスが形成された。一種は淡黄色の柔らかいカルスで、他の一種は白色で、比較的硬いカルスである。両者は Fig. 1

に示すとおり形態的に判別は容易であった。これらのカルス形成と個体再生の結果を Table 1 に示した。個体の再生が認められない処理区の一部は省略した。カルスの形成において、比較的 BA の添加量が少なく、NAA の添加量が多い培地において Y カルスの形成が増加し、その逆の組み合わせの添加培地において W カルスの形成が増加する傾向が認められた。Y カルスを個体再生用培地で 30 日間培養すると 2.0 mg/l BA と 9.0 mg/l NAA 添加培地で形成したカルスにおいてシュートと根が発生し、幼植物が再生した。W カルスを同様に培養すると、すべて濃緑色のプロトコーム様カルス^{2,6)}に変化し、シュ



Fig. 2 A regenerated young plant in culture bottle derived from whitish, compact callus of taro, cv. Dodare.

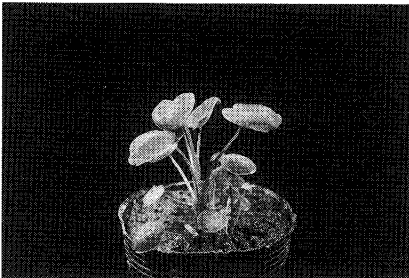


Fig. 3 A regenerated plant derived from whitish, compact callus of taro, cv. Dodare.

ートとほぼ同時に根が形成され個体が再生した (Fig. 2).

再生した生育初期の幼植物はピンセットによる株分けが可能であった。供試個体をオリジナル個体を含め3クローンに株分けし、再生用培地に移植すると、幼植物が生育し、ほぼ10日間で再び株分けが可能になった。そこで新しいクローンについて10日ごとに2回繰り返し株分けを行い、最終的に15クローンを得た。供試した両個体において、カルス形成のために使用したホルモンの影響は、形態的には認められなかった。個体の草丈がおよそ5 cm以上に生育するとピンセットによる株分けが困難になった。

再生した個体の順化は、移植後およそ10日間を多湿

に保つことで、可能であった (Fig. 3)。

サトイモのカルス培養に関する研究において、外植体として塊茎内部組織を供試している例はごく少なく¹⁰⁾、個体再生は報告されていない。サトイモ塊茎は保存が簡単で、しかも茎頂培養の例のように芽出しなどの前処理や、顕微鏡下での煩雑な摘出作業なしに大量の外植体が得られ、培養後の個体再生率も比較的高いことから、サトイモ品種改良のための形質転換体や培養変異の作出のための再分化系として十分利用可能である。

再生個体の生育初期において、シュートを株分けすることにより1個体当たり3から5個体の増殖が可能であった。一般にクローン増殖はホルモン添加培地を用いた茎頂培養によって行われている⁹⁾。しかし、本試験においてはホルモン無添加培地においてクローン増殖が可能であった。この方法はホルモン添加による変異体の発生の問題がなく、遺伝資源の *in vitro* 保存や増殖、あるいは栽培用苗の大量増殖にも応用可能と考えられる。なお元の品種と再生個体間の変異については今後の検討課題である。

東北農業試験場 番場宏治部長, 新野孝男主任研究官, 村山 徹主任研究官, 河合憲子主任の御協力に深謝する。

文 献

- 1) 高柳謙治, 1989. 遺伝資源集成(松尾孝嶺監修), p. 809-814, 講談社サイエンティフィック, 東京.
- 2) Abo El-Nil, M. M., F. W. Zettler, 1976. *Plant Sci. Lett.*, **6**: 401-408.
- 3) Chng, R. C. O., C. -J. Goh, 1994. *Plant Sci.*, **104**: 93-100.
- 4) Malamug, J. J. F., H. Inden, S. Yazawa, T. Asahira, 1992. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **60**: 935-940.
- 5) Nyman, L. P., J. Arditti, 1984. *Ann. Bot.*, **54**: 459-466.
- 6) 大澤勝次, 栗山尚志, 菅原祐幸, 1981. *野菜試報*, **A. 9**: 30-34.
- 7) Yam, T. W., S. Ichihashi, J. Arditti, 1991. *Ann. Bot.*, **67**: 317-323.
- 8) 村上賢治, 横山裕彦, 松原幸子, 1992. *園学雑*, **61**: 367-374.
- 9) Murashige, T., F. Skoog, 1962. *Physiol. Plant.*, **15**: 473-497.
- 10) Esenowo, G. J., 1986. *Environ. Exp. Bot.*, **26**: 159-162.

Summary

Plant Regeneration from Callus Induced from Tuber and *In vitro* Clonal Propagation of Taro, *Colocasia esculenta* Schott

Masamichi FURUYA

*Department of Crop Breeding, Tohoku National Agricultural
Experiment Station, Shinjo 996, Japan*

Calli were induced from tuber explants of *Colocasia esculenta* Schott cv. Dodare on a basal MS medium supplemented with BA, NAA, 30 g/l sucrose and 8 g/l agar for 130 days at 26°C in the dark. Protocorm-like calli were obtained by culturing whitish calli on a phytohormone-free MS medium for 30 days at 26°C with a 16-hour photoperiod, and plants were regenerated from them. An *in vitro* clonal propagation method was achieved by culturing regenerated young plants derived from whitish callus on a phytohormone-free MS medium at 26°C with a 16-hour photoperiod.