

サツマイモ培養細胞由来プロトプラストの培養

大谷基泰・島田多喜子

石川県農業短期大学農業資源研究所
(〒921 石川県石川郡野々市町末松)

(1987年7月3日受付)

(1987年8月7日受理)

プロトプラスト融合は、これまでの育種技術では交雑不可能な組み合わせの雑種植物を人工的に育成する可能性をもっている。

サツマイモ (*Ipomoea batatas* L.) において、サツマイモと交雑が不可能な同一交配不和合群内や近縁野生種の有用な遺伝子を導入する手段としてプロトプラスト融合が考えられる。サツマイモのプロトプラストの単離・培養については、Wu and Ma¹⁾ が茎カルスのプロトプラストを培養してカルスを得、Bidney and Shepard²⁾ は葉柄プロトプラストより不定根を形成させたという研究報告がある。最近、村田ら³⁾ は葉柄プロトプラストより再分化植物体を得た。本研究では、サツマイモの塊根カルス、茎カルスおよび懸濁培養細胞よりプロトプラストを単離し培養を行ったところ、比較的簡単な培養方法で容易にカルスを形成させることができ、さらにこれらのカルスより不定根を分化させることができたので、それらについて報告する。

カルス誘導: サツマイモ品種“鳴門金時”の塊根および“高系 14 号”の茎の外植片をカルス誘導培地に置床して、26℃、連続蛍光灯照明下で培養した。カルス誘導培地は、蔗糖濃度を 5% に変更した Linsmaier and Skoog (LS) 培地⁴⁾ に 0.5 mg/l 2, 4-D, 5 mg/l ABA, 3, 000 mg/l yeast extract (YE), 0.2% Gellan Gum を加えたものをを用いた。置床したすべての外植片より白色できわめて friable なカルスが形成された。

懸濁培養細胞系の確立: 品種“ベニアズマ”の葉柄および“高系 14 号”の茎の外植片よりカルス誘導培地上で誘導した培養 20~30 日目のカルスを既述のカルス誘導培地より Gellan Gum を除いた液体培地 (50 ml 容の三角フラスコあたり 25 ml の培地) に移植して、26℃、連続蛍光灯照明下、100 rpm で旋回振盪培養した。振盪

培養開始 3~4 週間目に等量の新鮮な培地を加え 1/2 に希釈して継代培養した。その後 3~7 日間隔で同様の方法により継代培養を行ったところ、生育の旺盛な懸濁培養細胞系を確立することができた (Fig. 1)。プロトプラストの単離・培養には、約 1 年間継代培養によって維持されている懸濁培養細胞を用いた。

プロトプラストの単離: 培養約 14 日目のカルスおよび継代培養後 3~4 日目の懸濁培養細胞を酵素液 (2% Cellulase Onozuka RS, 0.3% Pectolyase Y-23, 0.5% Macerzyme R-10, 0.5% hemicellulase, 1% Driselase, 13% mannitol を含む CPW 溶液⁵⁾, pH 5.6) に浸し、26℃、暗黒下、75 rpm で 4~5 時間振盪処理をしてプロトプラストを単離した。処理後、プロトプラストを含む酵素液を 50 μ m ナイロンメッシュで濾過し、800 rpm で 3 分間の遠心分離により生じた沈殿に 0.55 M 蔗糖液を加えて再び 800 rpm で 3 分間の遠心分離を行いプロトプラストのみを浮遊させて集めた。集めたプロトプラストを W5 溶液⁶⁾ で 2 回洗浄した。プロトプラストの収量は、カルス、懸濁培養細胞ともに $1\sim2\times10^6$ cells/g fr wt であった (Fig. 2, 4)。

プロトプラストの培養: 洗浄したプロトプラストを 0.1 mg/l 2, 4-D, 0.5 mg/l kinetin, 0.1 M 蔗糖, 0.3 M mannitol, 100 mg/l inositol を加えた改変 N₆ 液体培地⁷⁾ に懸濁し、その懸濁液を 60×15 mm のプラスチックシャーレに 4 ml 入れ、パラフィルムで密封し、26℃、暗黒下で培養した。培養密度は $0.4\sim1.0\times10^6$ cells/ml に調整した。プロトプラストは、培養 2 日目に最初の分裂を開始し、その頻度は 5 日目で約 25% であった。培養 10 日目に、カルス増殖用培地 (0.5 mg/l 2, 4-D, 5 mg/l ABA, 3, 000 mg/l YE, 0.4 M 蔗糖を含む改変 LS 液体培地) を 1 ml 加えた。培養 30 日目に、培地中に形

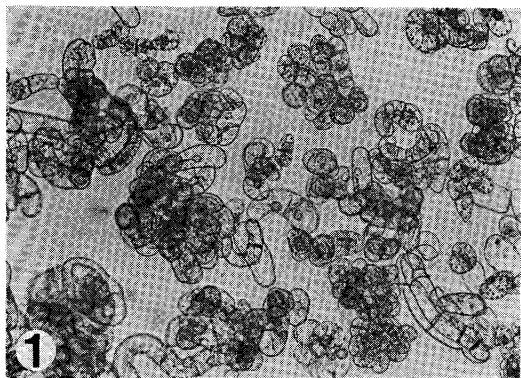


Fig. 1. Suspension cultures.

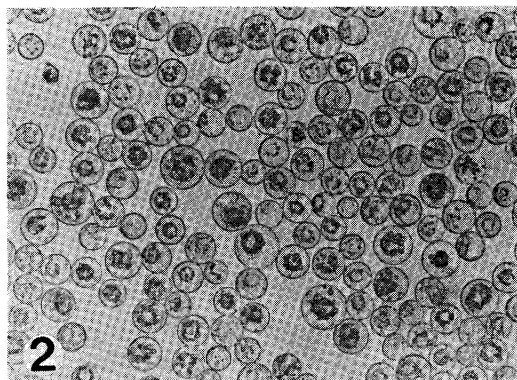


Fig. 2. Freshly isolated protoplasts from suspension cultures.

Fig. 3. Calli from suspension culture protoplasts.

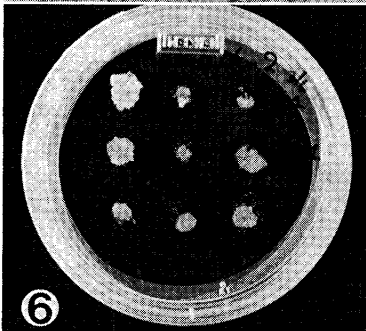
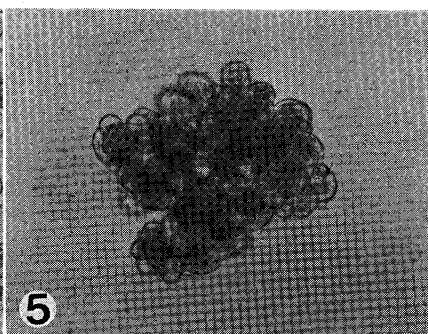
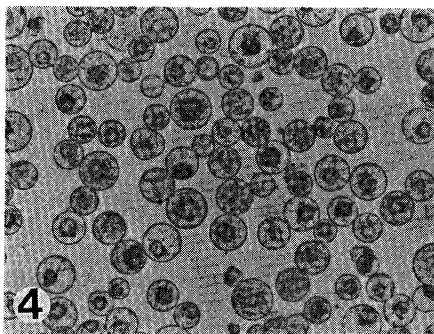
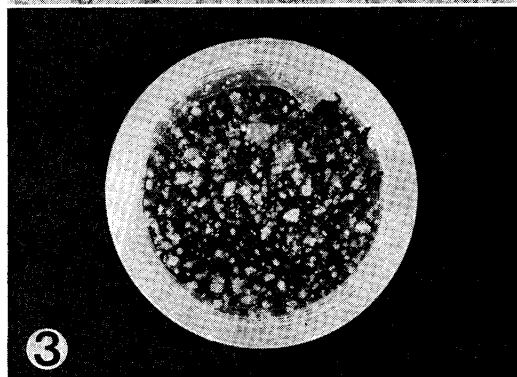


Fig. 4. Freshly isolated protoplasts from stem callus.

Fig. 5. Colony formation from stem callus protoplast.

Fig. 6. Calli from stem callus protoplasts.

Fig. 7. Root differentiation from protoplast-derived callus.

成されたコロニー (Fig. 5) をカルス増殖用 Gellan Gum 培地 (0.12% Gellan Gum を含む) 中に包埋して小カルスを得た (Fig. 3). この小カルスをさらに、カルス誘導培地上に移植してカルスを生長させた (Fig. 6). 直径が 5 mm 以上になったカルスを種々の濃度のオーキシシン (NAA, IAA) とサイトカイニン (BA, kinetin) を単独あるいは組み合わせた再分化培地に移植したところ、塊根カルスおよび茎カルス由来プロトプラストで、移植後 40 日目に、1.0 mg/l IAA, 0.5 mg/l BA, 3,000 mg/l YE, 0.2% Gellan Gum を加えた LS 培地上で不定根が分化した (Fig. 7). 本研究では、懸濁培養細胞由来プロトプラストからは器官形成がみられなかった。これは、懸濁培養細胞の分化能が長期間の継代培養によって低下したためと考えられる。

以上のように、カルスおよび懸濁培養細胞より効率的に健全なプロトプラストを単離することができ、これらのプロトプラストより簡単な培養方法で多くのカルスを

得ることができた。また、この方法は、サツマイモの葉肉プロトプラストの培養にも効果的であった⁸⁾。

文 献

- 1) Wu, Y. W., T. P. Ma, 1979. Acta Bot. Sin., **21**: 334-338.
- 2) Bidney, D. L., J. F. Shepard, 1980. Plant Sci. Lett., **18**: 335-342.
- 3) 村田達郎, 星野匡樹, 宮司佑三, 1986. 育種学雑誌 36 巻 別冊 2; p. 236-237.
- 4) Linsmaier, E. M., F. Skoog, 1965. Physiol. Plant., **18**: 100-127.
- 5) Frearson, E. M., J. B. Power, E. C. Cocking, 1973. Dev. Biol., **33**: 130-137.
- 6) Menczel, L., K. Wolfe, 1984. Plant Cell Rep., **3**: 196-198.
- 7) Chu, C. C., 1978. Proc. Symp. Plant Tissue Culture, p. 43-50, Science Press, Peking.
- 8) Otani, M., T. Shimada, H. Niizeki, 1987. Plant Sci., **53**: 157-160.

Summary

Callus Formation and Root Differentiation by Protoplasts from Cultured Cells of Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L.)

Motoyasu OTANI and Takiko SHIMADA

Research Institute of Agricultural Resources, Ishikawa Agricultural College, Suematsu, Nonoichi-machi, Ishikawa, Japan 921

Protoplasts were isolated from callus and suspension cultures of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). Isolated protoplasts began to divide two days after the start of culture in liquid modified N₆ medium and formed colonies in 30 days of culturing. The colonies transferred to solid medium grew rapidly and differentiated into calli. Some of the calli transplanted on the regeneration medium produced roots.