

組織培養由来のサトイモの苗質に関する研究

秋田 求、太田 喜元

要 約

培養由来のサトイモ貯蔵器官（球茎）の苗質を評価する目的で、培養直後の球茎の乾燥耐性および球茎中に含まれる貯蔵物質（デンプン、レクチン）の含量を測定した。培養由来の球茎は、実験室内において速やかに萎れた。貯蔵物質の含量は市販の球茎よりも著しく低かった。これらの結果から、培養由来の球茎は貯蔵器官としての発達が不十分と判断された。培養条件によって貯蔵物質の含量は影響され、その含量は順化率に関係する可能性が示唆された。

緒 論

組織培養技術を利用して優良種苗を大量に生産する方法は、特にイモ類など種子繁殖に向かない作物に対して有用である。なかでも、培養中にその貯蔵器官を直接に生産する方法は、得られた苗の順化が不要かまたはきわめて簡単であること、取り扱いが容易であること、貯蔵がきくこと、などの特長を有するため、早くから注目されてきた。例えば、ジャガイモの培養由来の塊茎は、マイクロチューバーとも呼ばれ、その実用性が広く認められている。すでに商業生産が行なわれており、培養槽を用いた効率的な生産技術も開発されている（1）。しかし、一般に貯蔵器官の培養にはその植物の茎葉部を増殖させる場合よりも長期間を必要とし、一回の培養で得られる種苗の数も少なくなる。この効率の低さが、培養による貯蔵器官の大量生産を実用化するうえで大きな問題となっている。そこで、我々は、組織培養法による植物貯蔵器官の大量増殖技術の実用化を目標に、特に、培養装置の簡略化を中心的な課題として検討を行って来た。その結果、サトイモを材料に簡易型の培養装置を開発することに成功した（2）。さらに、同様の培養装置を用いたジャガイモの塊茎生産法も明らかにした（3）。

一方、サトイモでは、ジャガイモの場合（4）と異なって、培養後の植物体（球茎）の保存がきかないことが観察された。すなわち、少なくとも我々の採用した培養方法（5）では、球茎は効率的に生産できるものの、得られる球茎に休眠性が見られないことがわかった。このことは、培養後はすみやかに順化作業を行わなければならないこと、従って培養由来の球茎は貯蔵性の面で問題があることを意味している。前述のように、培養中に直接に貯蔵器官を形成させる目的のひとつは貯蔵性の確保であり、その意味で本培養方法には課題が残されていることになる。しかし、これまでに、貯蔵器官として成熟したものであるかどうかを判断する指標として適当なものは知られておらず、例えば、形状や大きさ、乾物率などから経験的に判断されてきたにすぎない。そこで、本研究では、培養由来のサトイモ球茎について、特に、乾燥耐性や順化容易性と、組織中のタンパク質含量や澱粉含量との関係に注目して解析を試みた。

貯蔵組織には、貯蔵タンパク質と総称される特徴的なタンパク質が蓄積されることが知られているが、近年、サトイモ類ではレクチンが貯蔵タンパク質であることが報告されている（6）。そこで、アフニティカラムを用いて培養物中のレクチンを粗精製し、その量を測定した。澱粉もまた代表的な貯蔵物質の一つである。本研究では、これらの含量を指標として培養由来の植物体の貯蔵器官としての質を評価する可能性について明らかにした。

実験方法

1. 実験材料

材料にサトイモ（品種名・石川早生）を用いた。培養系は高山真策教授（東海大学開発工学部）より供試された。培地として、 NH_4NO_3 、 KNO_3 および CaCl_2 の量（以下A成分強度）を、すべて1/8、1/4、1/2としたMurashige and Skoog培地（7）（以下1/8-A、1/4-A、1/2-Aと表す）を用いた。培地には4-PUを1mg/lとサッカロース60g/lを加え、pHを5.6としたのちオートクレーブ殺菌した。培地量は100ml三角フラスコあたり40mlとした。サトイモ外植片を移植し、下方照明型の振とう培養機を用いて培養した。温度は25°Cとした。振とう速度は約90rpmとした。光合成有効光量子フラックスは棚面（下方向）で約130~180 $\mu\text{mol}/\text{s}/\text{m}^2$ であった。日長は12時間とした。培養期間は、約1カ月間とした。

2. タンパク質および澱粉含量の測定

タンパク質含量は、Bradford法により測定した。-20°C下で凍結させたサトイモ植物体を0.2M NaCl水溶液中で破碎し、上清にCBB色素試薬（ナカライテスク、京都）を加えて発色させ、全タンパク質量とした。従って、本研究でいうところの全タンパク質量とは、可溶性のタンパク量を意味している。また、粗抽出液をasialofetuin-Sepharose 4Bカラムを用いて精製し（6）、その結合タンパク量をBradford法により同様に測定してレクチン量とした。asialofetuin-Sepharose 4Bは、CNBr活性化Sepharose 4B（Pharmacia、Uppsala）を用い取扱書に従って調整した。澱粉含量は、-20°C下で凍結させたサトイモ植物体をアルカリ抽出後、グルコアミラーゼ-グルコースオキシダーゼ法によって測定した（8）。

3. 順化条件

培土として、バーミキュライトとピートモスを1:1に混合したものをを用いた。順化には、プラスチックバット、または、底面給水式プランターを用いた。給水は、水分減少量を観察し適宜おこなった。

順化は陽光恒温槽（Model FLI-300N、東京理科、東京）内で行った。このとき、陽光恒温槽内は、相対湿度約67%であり、カバーをしていない状態での培土表面の相対湿度は約75%であった。温度は25°C一定とした。陽光恒温槽内の棚面における光合成有効光量子フラックスは、約85 $\mu\text{mol}/\text{s}/\text{m}^2$ であった。日長は12時間とした。

培養物は、水道水で洗浄後、直ちに、十分に水分を含ませておいた培土に移植した。移植後1週間は容器をサランラップで被い、それ以後は、完全にサランラップを除去した。

4. 湿度等の測定

湿度は、携帯式温湿度計（Model 2451、横河インスツルメンツ、長野）または、自記温湿度記録計（Model NS2-Q、佐藤計量器製作所、東京）を用いて測定した。また、光強度は、光量子計（Model LI-189、盟和商事、大阪）を用いて測定した。

実験結果および考察

1. 培地組成がサトイモ培養苗の保存性に及ぼす影響

培養物をフラスコから取り出して水洗し、直ちに秤量皿に置き、乾いたペーパータオルを培養物の上にのせただけの状態で培養室内（23°C、相対湿度約60%）に8日間放置したときのサトイモ植物体の重

量の変化を測定した。結果を図1に示した。測定開始1日目における重量の減少は1/8-Aの培地で培養したもので最も大きかったが、他の場合と比較して顕著な差ではなかった。また、測定終了時には1/2-Aの培地で培養した場合で最も大きく重量が減少していた。測定の際植物体を順化した、すでにすべてが枯死していた。すなわち、市販の種イモやジャガイモマイクロチューバーとは違って、植物体をそのまま室内に保存することはできなかった。このことから、サトイモでは培養後の乾燥を防ぐための措置が重要であり、ジャガイモ等と異なった苗生産体制を取らざるを得ないこと、すなわち、培養後直ちに適当な条件で順化作業を行い、苗に仕立てて利用する方法を採用せざるを得ないものと考えられた。

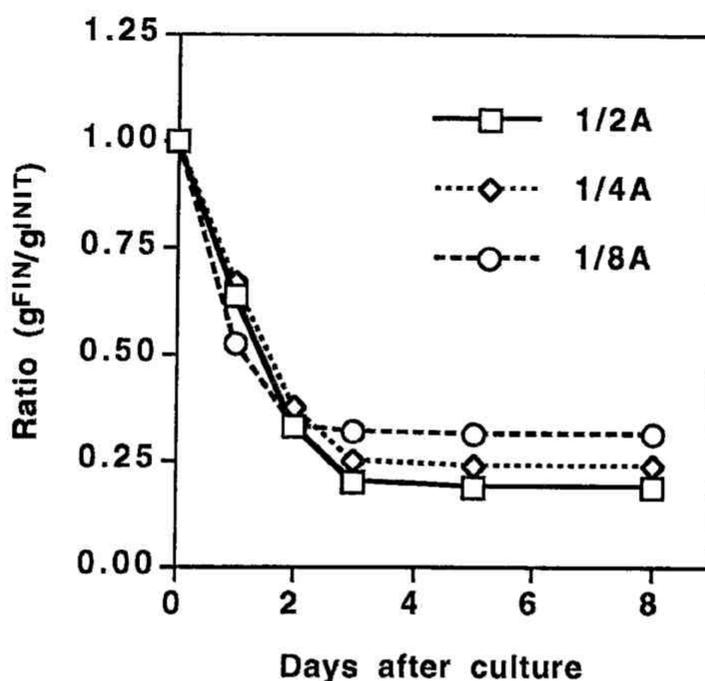


図1 培養後の重量減少率に培地A成分濃度の及ぼす影響
(g^{FIN} = 室内放置後の新鮮重、 g^{INIT} = 培養直後の新鮮重)

2. 培地組成がサトイモ培養苗の苗質に及ぼす影響

表1に、培地中のA成分強度と順化率、および培養物中の蛋白質含量、澱粉含量との関係を示した。ただし、1回の培養で得られた50個の球茎を順化し、1カ月経過後の生存率をもって順化率とした。

表1 培地組成がサトイモ培養苗の順化率と蛋白質および澱粉含量に及ぼす影響

Medium	Rate of acclimatized plants (%)	Protein content (mg/gDW)		Glucose content (mmol/gDW)	
		Total	Lectin	Total	As Starch
1/8-A	38	7.81±1.08	0.198	0.781±0.175	0.440±0.0795
1/4-A	80	7.51±0.654	0.365	1.17±0.137	0.625±0.129
1/2-A	72	8.63±0.458	0.306	1.07±0.0281	0.494±0.0185

(Mean ± SE, n = 3)

培地中のA成分強度は、順化率に影響した。特に1/8-Aでは、順化率は40%以下であった。一方、1/4強度以上のA成分を含むMS培地を用いた場合、順化率は70%以上であった。この結果は、培養液中の基質量の不足が順化率の低下をもたらすことを示しているものと考えられる。実際、培養終了の1週間前に新鮮培地に移し替えて培養した場合には順化率が高まることも観察されている(結果省略)。ジャガイモでは、炭素源に対する窒素源の量の相対的な減少が貯蔵器官の発達を促進させることが知られているが、サトイモの場合には、むしろ茎葉部の成長を促進させる条件で培養されることが順化率を高めるうえで必要と考えられた。

一方、タンパク質および澱粉の含量は、市販のサトイモ(第4訂食品成分表による)に比べて明らかに低かった。市販のサトイモには乾物1gあたり約100mgのタンパク質が含まれ、その25%以上はレクチンであると言われているが(6)、これらに比較して、培養物中の全タンパク質量およびレクチン量はその1/10に満たなかった。また、レクチン含量は、順化率の低かった1/8-Aの培地で培養された場合に最も低くなった。澱粉含量についても、市販のサトイモの1/5以下であった。特に順化率の低かった1/8-Aでは、他よりも明らかに澱粉含量が低かった。これら、貯蔵成分の主要な部分を占めると考えられる貯蔵態のタンパク質および澱粉の含量から判断して、本培養条件下で得られたサトイモ球茎は、一般に、貯蔵器官として未熟であると考えられた。

本実験の結果から、順化率とレクチンおよび澱粉含量との間に相関がある可能性が考えられた。すなわち、順化率の最も高かった1/4-Aの培地を用いた場合で最もレクチンおよび澱粉の含量が高かった。レクチン含量が全タンパク質に占める割合も1/4-Aにおいて最も高くなった。1/4-Aと1/2-Aにおける順化率に有意差が認められるか否かについては今後確認を要するものと考え、少なくとも、明らかに順化率が低かった1/8-Aでこれらの成分の含量が低かったことは興味深い。

総括

本研究の結果、サトイモの場合には、培養由来の球茎は未熟で乾燥に弱いことがわかった。しかしながら、本実験で行ったような簡単な方法で80%程度の個体が順化できることから、培養物の順化容易性という特長を備えていると判断することができる。

本研究から、培養物中に含まれるレクチンと澱粉の量は、苗質(順化率)を反映している可能性が示唆された。今後さらに種々の条件で得られた培養物について同様の測定を行い、順化率とこれらの成分との相関性を確かめる必要があるものと考えられる。

一般に、培養由来の貯蔵器官はその外観や大きさで評価され、また、それによって苗質をほぼ正確に把握できる場合も多い。しかし、少なくともサトイモでは、貯蔵器官として未熟な球茎が生産されていることになり、従って、苗質を評価するための適切な指標を明らかにし、そのうえで、より実用性の高い種苗を生産するための条件について検討する必要があるものと考えられる。レクチンや澱粉の含量は、その際に有用な指標となる可能性があるものと考えられる。

謝辞

本研究にあたり、実験材料を高山真策教授(東海大学開発工学部)に提供して頂きました。ここに深く感謝の意を表します。

引用文献

1. Akita, M. and S. Takayama (1994) Induction and development of potato tubers in a jar fermentor, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 36, 177-182
2. Akita M. and Y. Ohta (1996) Development of a system for mass propagation of *Colocasia esculenta* in large scale without forced aeration. *Acta Horticulturae*, 440, 554-559
3. Akita, M. and Y. Ohta (1998) A simple method for mass propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.) using a bioreactor without forced aeration. *Plant Cell Reports*, 18, 284-287
4. Akita, M. and S. Takayama (1993) Resting period and field performance of potato tubers propagated in a jar fermentor, *Plant Tissue Culture Letters*, 10, 255-259
5. 高山真策、石尾慎史、秋田求、大沢勝次 (1989) ジャーフェーマンターによるサトイモ科植物の大量増殖に関する研究 (第2報) サトイモ球茎の大量増殖、*園芸学会雑誌*、58 (別1)、234-235
6. Van Damme, E. J., K. Goossens, K. Smeets, F. Van Leuven, P. Verhaert, and W. J. Peumans (1995) The major storage protein of Araceae species is a lectin, *Plant Physiology*, 107, 1147-1158
7. Murashige, T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497
8. 佐々木堯 (1986) 澱粉およびグリコーゲンの分離、定量、調整、In: 中村道徳、貝沼圭二編, 澱粉・関連糖質実験法、学会出版センター、東京、pp 5

英文要旨

Estimation of quality of *in vitro* propagated corms of yam (*Colocasia esculenta*)

Motomu Akita and Yoshimoto Ohta

Quality of *in vitro* propagated corms of yam (*Colocasia esculenta* cv. Ishikawawase) as the seed plants was estimated. *In vitro* derived corms were easily wilted when they were kept under the room condition. The contents of two kinds of reserve substances, starch and lectin, were significantly less than those in the field grown corms. These results indicate that development as the storage organ is insufficient in *in vitro* propagation of corms. Composition of the medium influenced on the content of these reserve substances which may affect on the efficiency of acclimatization of the corms.