

## 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の分化

誌名	九州農業試験場報告
ISSN	03760685
巻/号	281
掲載ページ	p. 17-28
発行年月	1993年3月

# 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 及び不定根の分化

吉永 優・小巻 克巳<sup>1)</sup>

(1992年7月3日受理)

吉永 優・小巻克巳：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の分化。九州農試報告 28：17～28, 1993.

カンショ育種において細胞融合やエレクトロポレーションなどの外来遺伝子導入技術を利用するためには、効率的で再現性のあるプロトプラスト培養技術を確立することが必須である。本研究では、葉身や embryogenic callus からのプロトプラストの分離・培養法を検討した。葉身由来のプロトプラスト培養においては、サイトカイニンの種類により効果が異なった。すなわち、ゼアチンの方がカイネチンよりコロニー形成の効率が高かったが、好適なゼアチン濃度は供試した系統により異なった。これらのコロニーを増殖して得た小カルスの再分化培地での培養においては、ベンジルアミノプリン (BAP) の添加により、不定根を多数得たが、不定芽の分化は認めなかった。一方、プロトプラストの分離材料として embryogenic callus を用いた試験では、まず多数の品種・系統の生長点近傍組織から embryogenic callus の出現頻度に及ぼす 2,4-D 濃度の影響を明らかにした。次に、'ホワイトスター' の embryogenic callus では大量のプロトプラストを分離し、寒天培地に包埋して培養することにより、分裂後、微小なカルスを形成した。微小カルス形成に最適な培地は、修正 LS 培地に低濃度の 2,4-D 及び高濃度のカイネチンを添加したものであった。しかし、微小カルスはしだいに褐変・枯死または non-embryogenic callus へと変化し、embryogenic callus を増殖するには至らなかった。

## I. 緒 言

カンショ (*Ipomoea batatas* (L.) LAM.) の自家不和合性並びに種内の異系統間交配において認められる交雑不和合性は、交配育種によって遺伝変異の拡大を図る際の大きな障壁となっている。この障壁を打破する方法としては、細胞融合やエレクトロポレーションなどの外来遺伝子導入技術は極めて有効であるが、この場合、効率的で再現性があり、容易に適用可能なプロトプラスト培養技術が確立されていることが前提となる。

プロトプラスト培養では、容易に大量のプロトプラストが得られる葉身が分離材料としてよく用いられる。しかし、カンショにおいては、葉身からのプロトプラスト分離が困難である<sup>1)</sup>ところから、葉柄を材料に用いることが多く<sup>1, 4, 8, 10)</sup>、葉柄由来プロトプラストからのカルス形成、不定芽分化を経て低頻度ではあるが、再分化植物体が得られている<sup>4, 8, 10)</sup>。また、その場合、再分化効率を向上させるため、再分化培地へのアミノ酸<sup>8)</sup>や硝酸

銀の添加<sup>4)</sup>、カルスの乾燥処理<sup>11)</sup>などが試みられているが、効果は明瞭でない。

野外で生育した植物の葉身に比べて、苗条培養等で得た無菌植物の葉身はプロトプラスト分離に適するとされ<sup>3)</sup>、カンショにおいても、無菌植物を供試している報告がある<sup>4)</sup>。近年、福岡<sup>4)</sup>は葉身由来のプロトプラスト培養により得たカルスから低頻度ながら不定胚や不定芽を分化させた。

単子葉植物においては、プロトプラストからの植物体再分化効率の向上のため、不定胚形成能の高い embryogenic callus の懸濁培養細胞を材料に用いている<sup>12)</sup>。カンショでも生長点近傍組織から効率的に embryogenic callus を作出・増殖する方法が CANTLIFFE ら<sup>3)</sup>及び小巻ら<sup>5)</sup>によって報告されており、福岡<sup>4)</sup>はこの方法で得た embryogenic callus から分離したプロトプラストを培養し、カルスを経て、不定芽を再分化させた。

本研究では、カンショのプロトプラスト培養系を確立するため、培養例の少ない葉身を用いたプロトプラスト培養を試み、小カルスを得るための培養条件や小カルスからの植物体再分化条件を検討した。さらに、多数の品種・系統を用いて、生長点近傍組織から embryogenic callus を効率良く誘導するための培地条件の検討、さらに embryogenic callus を用いたプロトプラスト培養を実施した。

なお、本研究は農林水産省のバイオテク植物育種に関する総合研究(昭和61年～平成元年)及び地域バイオテクノロジー研究(昭和61年～平成2年)の研究課題の一部として行われたものである。

本研究の遂行に当たっては、前甘しょ育種研究室長の久木村 久氏(現中国農業試験場作物開発部長)や現甘しょ育種研究室長の山川 理氏に御指導いただいた。心から感謝の意を表する。

## II. 試 験 方 法

### 1. 葉身由来プロトプラストの培養

植継ぎ後約3週間経過した‘中支8号’、‘中国37号’及び‘台農10号’の無菌植物の葉身を細断後、第1表に示す酵素液に3.5時間浸漬し、25°C、暗黒条件で振盪(40rpm)した。処理後50 $\mu$ mのナイロンメッシュで未消化組織や残渣を除去し、酵素液から酵素だけを除いた組成の洗浄液を加え、600rpmで3分間遠心分離し、上清を除いた。

つぎに、第1表に示す組成のフローティング液にプロトプラストを懸濁し、その上に洗浄液を静かに重層し、600rpmで3分間遠心分離した。さらに、浮上したプロトプラストを集め洗浄液で1回洗浄した。‘中支8号’及び‘中国37号’のプロトプラストは、第2表に示す基本培地にオーキシンとサイトカイニンを組み合わせた計12種類の培地条件(第3表)で、2反復して培養した。なお、いずれもプロトプラスト密度は $1 \times 10^5$ /mlとし、27°C、暗黒条件で培養した。また、これらの培養では、培養開始約3週間後から1か月ごとに3回、培養液のマニトール濃度を半量にしたうすめ液を添加し、浸透圧を下げた。

培養開始から約4か月後に得られたコロニーを第4表に示す固形培地にプレーティングした。さらに、固形培地上で2～3mmの大きさに増殖した小カルスを第4表に示す再分化培地に移植した。

Table 1. Composition of enzyme and floating solutions for protoplast isolation

	Enzyme solution		Floating solution
	Mesophyll cells	Embryogenic callus	Mesophyll cells
Mannitol	0.4M	0.4M	—
Sucrose	—	0.17M	0.8M
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	10mM	—	10mM
MES	3mM	3mM	3mM
Glycin	0.1M	—	—
Cellulase	2.0% <sup>a)</sup>	0.5~2.0% <sup>b)</sup>	—
Pectinase	0.1% <sup>c)</sup>	0.5~2.0% <sup>d)</sup>	—
Mineral salt	—	LS(1965) <sup>e)</sup>	—
pH	5.6	5.8	5.8

a) Cellulase Onozuka RS, Yakult Honsha Co., Tokyo, Japan

b) Cellulisin, Calbiochem, La Jolla, CA, USA

c) Pectolyase Y23, Seishin Pharmaceutical, Tokyo, Japan

d) Macerozyme, Yakult Honsha Co., Tokyo, Japan

e) Linsmaier and Skoog (1965)<sup>e)</sup> salts mixture

Table 2. Composition of culture medium for protoplasts

	Sources of protoplasts	
	Mesophyll cells	Embryogenic calli
Mineral salt	modified MS <sup>a)</sup>	modified LS <sup>b)</sup>
Mannitol	0.2M	0.4M
Glucose	0.2M	—
Sucrose	1.0%	3.0%
MES	3mM	—
Gelling agent	0.1% Agarose <sup>c)</sup>	0.3% Agar, no addition
pH	5.8	5.8

a) Murashige and Skoog (1962)<sup>a)</sup>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 200 mg/l, KNO<sub>3</sub> 1000 mg/l,b) Linsmaier and Skoog (1965)<sup>b)</sup>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 200 mg/l, KNO<sub>3</sub> 950 mg/l, KCl 750 mg/l

c) Sea Plaque Agarose.

Table 3. Effects of combined growth regulators on cell division and colony formation from mesophyll protoplasts<sup>a)</sup>

2,4-D (mg/l)	NAA (mg/l)	Kinetin (mg/l)			Zeatin (mg/l)		
		0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0
0.2	0.0	—	+	+	+++		++
0.2	0.5					+++	
0.5	0.0	—	+	++			
1.0	0.0	—	++	++			

a) Mesophyll protoplasts were prepared from *I. batatas* var. Chugoku-37 and cultured for 50 days. —, no cell division; +, 2 cell division; ++, 2-10 cell division; +++, colony formation.

Table 4. Medium composition for callus production and regeneration

	Sources of protoplasts		
	Mesophyll cells		Embryogenic calli
	Colony production	Regeneration	Small calli production
Mineral salt	1/2MS	MS	modified LS <sup>a)</sup>
Sucrose	3%	3%	3%
Mannitol	—	—	0.0~0.4M
Gelling agent	0.2% Gerlite	0.2% Gerlite	0.6% Agar
2,4-D	0.2mg/1, 0.5mg/1	—	0.11~2.2mg/1
NAA	—	0.0, 0.2mg/1	—
BAP	—	0.5, 1.0, 2.0mg/1	—
KIN	—	—	0.11~1.1mg/1
pH	5.8	5.8	5.8

a) Linsmaier and Skoog (1965)<sup>a)</sup>, KCl 2240mg/l

## 2. 生長点近傍組織からの embryogenic callus の誘導

温室内で生育させた70品種・系統の蔓の先端部を70%エタノールに30秒間、さらに有効塩素1%の次亜塩素酸ナトリウムに10分間浸漬した後、0.5mm程度の茎頂を摘出し、LINSMAIER and SKOOG (1965)<sup>a)</sup>培地（以下LS培地と略す）に1.1~3.3mg/lの2,4-D、3%のショ糖、0.6%の寒天を添加したカルス誘導培地に置床した。外植片数は1試験区当たり3~5個とし、27°C、暗黒条件下で培養した。培養8週間後に embryogenic callus の出現数を調査した。さらに、これらのカルスを1/2濃度のNH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>にした修正LS培地、ショ糖3%及び0.8%の寒天からなる胚誘導培地に移植した。

embryogenic callus からの植物体再分化には‘台農10号’、‘中国8号’及び‘フクワセ’の3品種を用いた。カルスの移植後1週間は暗黒とし、以後は16時間日長条件下に置いた。約1か月経過後に、魚雷型後期あるいは子葉型期にある胚を、無機塩を1/2濃度にしたLS培地に3%のショ糖及び0.8%の寒天を加えた胚発芽培地に移植した。培養温度は27°Cとした。

## 3. embryogenic callus 由来プロトプラストの培養

継代培養後4~10週間経過した‘ホワイトスター’の embryogenic callus、250mgを第1表に示す酵素液5mlに浸漬した。酵素処理は27°C、暗黒下で振盪(60rpm)しながら4~18時間行った。処理後、41μmのナイロンメッシュで未消化カルスなどを除去し、洗浄液を用いて700rpm、5分間遠心分離による洗浄を3回繰り返した。プロトプラストを第2表に示す培地を用い、4~5×10<sup>4</sup>/mlの密度で培養した。培養条件は27°C、暗黒とした。微小カルスを増殖するため、第3表のようにLS培地にマニトール、生長調節物質として2,4-D及びカイネチンを添加した固形及び液体培地を用いた。

### III. 試験結果

#### 1. 葉身由来プロトプラストの培養

プロトプラストの収量は、‘中支8号’で $1.3 \times 10^6$ 個/f.w.g., ‘中国37号’で $3.0 \times 10^6$ 個/f.w.g., ‘台農10号’で $1.8 \times 10^5$ 個/f.w.g.であった。

‘中支8号’の培養2週間後のプロトプラストの分裂率は、第5表に示すように、カイネチンを用いた区で最も高く、0.5mg/lのゼアチン区では最も低かった。0.1mg/lゼアチン区の分裂率は0.5mg/lのBAP区とほぼ同じであった。培養2か月後には、0.2mg/lの2,4-Dに0.1mg/lのゼアチンを添加した区でのみコロニーが形成された。

‘中国37号’の葉身由来プロトプラストは第3表に示すように、総計12通りの培地のうち9つの培地で、培養後約2週間頃から分裂を開始したが(写真1-a), 0.1mg/lのカイネチン添加区では分裂が見られなかった。また、一部の培地では、その後分裂を停止し、0.2mg/lの2,4-Dと1.0mg/lのゼアチンを組合せた培地では、分裂は続けるが、しだいに培地が褐変した。0.2mg/lの2,4-D, 0.1と0.5mg/lのゼアチンを添加した区では2反復ともプロトプラストの分裂やコロニー形成の効率が良く、50日後にはコロニーが肉眼で判定できた。

‘中国37号’のプロトプラストから得られたコロニーを、第3表に示す固形培地にプレー

Table 5. Effects of combined growth regulators on cell division and colony formation from mesophyll protoplasts<sup>a)</sup>

Auxin (mg/l)		Cytokinin (mg/l)			
2,4-D	NAA	Zeatin		Kinetin	BAP
		0.1	0.5	0.5	0.5
		%	%	%	%
0.2	0.0	3.13 <sup>b)</sup> (+++) <sup>c)</sup>	—	—	—
0.2	0.5	—	0.5 (-)	5.92 (+)	3.07 (+)

a) Mesophyll protoplasts were prepared from *I. batatas* var. Chushi-8.

b) Frequency of cell division after two weeks of culture.

c) Colony formation after two months of culture: —, no cell division; +, 1-10 cell division; +++, colony formation.

Table 6. Effect of NAA and BAP concentrations on root production from calli

NAA (mg/l)	BAP (mg/l)	No. of calli transferred	No. of calli producing roots	Percentage of calli with roots
0.0	0.5	40	16	40.0
0.0	1.0	25	8	32.0
0.0	2.0	57	8	14.0
0.2	0.5	27	19	70.4
0.2	1.0	34	7	20.6
0.2	2.0	21	12	57.1

ティングし、約2か月間増殖し、さらに第6表に示す6種類の再分化培地に置床したところ、すべての培地で不定根が発生した(写真1-c)。根の発生頻度はベンジルアミノプリン濃度を0.5mg/lにした区で高い傾向にあった。これらの根はその表面に白く、細かい毛の生じたものなど様々であったが、培養継続後も不定芽の分化は認められなかった。

‘台農10号’のプロトプラストは、0.2mg/lの2,4-Dと0.1mg/lのゼアチンを添加した区で培養したが、分裂は認められなかった。

## 2. 生長点近傍組織からの embryogenic callus の誘導

供試した総計70品種・系統の15.7%にあたる11品種・系統で embryogenic callus が得られた(第7表, 写真2-a)。その形成頻度はいずれも11%から50%で、50%以上の品種・系統は見られなかった。2,4-D濃度と embryogenic callus の出現頻度は第8表に示すように、‘台農10号’では2,4-D濃度に関係なく、置床した茎頂のすべてから embryogenic callus が得られた。‘コガネセンガン’では1.1mg/l区でのみ embryogenic callus が出現した。‘高系14号’及び‘ベニハヤト’では1.1mg/l区で、‘豊木’、‘ホホワイトスター’及び‘中支8号’では2.2mg/l区で出現頻度が高かった。

embryogenic callus から誘導された不定胚数及び不定胚から得られた植物体数を第9表に示した。いずれの品種においてもカルス当たり魚雷型後期～子葉型期胚数が2～3個であった(写真2-b)。さらに、それら成熟胚の約2/3が植物体へと生長し、合計31個の幼植物体を得た(写真2-c)。

## 3. embryogenic callus 由来プロトプラストの培養

embryogenic callus からのプロトプラスト収量については第10表に示すように、いずれの酵素条件でも  $1 \sim 2 \times 10^7$  個/gであった。embryogenic callus 由来のプロトプラストは、寒天培地に包埋した区でのみ培養後3～4週間後に分裂を開始し、急速に増殖した(写真3-A)。分裂開始後10～14日以内に径0.1～0.3mmの微小カルスを形成した(写真3-b)。



Photo. 1. Culture of mesophyll protoplasts from *I. batatas* var. Chugoku-37.

- a) Cell division observed after 20 days of culture.
- b) Cell aggregate after 50 days of culture.
- c) Adventitious root formation from callus on regeneration medium.

Table 7. Distribution of frequencies of embryogenic calli developed from apical meristems of 70 genotypes of *I. batatas*<sup>a)</sup>

No. of genotypes	Number of embryogenic calli/explants (%)					
	0	1-10	11-20	21-30	31-40	41-50
59	0	4	3	2	2	0

a) Explants (3-5 pieces) from each genotype were cultured for eight weeks and checked for their production of embryogenic calli.

Table 8. Effect of 2,4-D on the formation of embryogenic calli

Variety	2,4-D concentration (mg/l)		
	1.1	2.2	3.3
White star	—	66.7	0.0
Kokei-14	54.5	50.0	33.3
Koganesengan	8.3	0.0	0.0
Benihayato	44.4	28.6	11.1
Chushi-8	0.0	25.0	16.7
Tainung-10	100.0	100.0	100.0
Toyoki	30.7	45.4	7.1

Table 9. Development of embryos and plantlets from embryogenic calli

Variety	No. of calli transferred	No. of embryos	No. of plantlets
Fukuwase	3	8	5
Chugoku-8	5	14	10
Tainung-10	14	30	16
Total	22	52	31

Table 10. Yields of protoplasts from embryogenic calli<sup>a)</sup>

Concentration (%)		Treatment length (hrs)	Yield of protoplasts ( $\times 10^7$ )
Cellulase <sup>b)</sup>	Pectinase <sup>c)</sup>		
0.5	2.0	16~18	1.6~2.2
0.5	2.0	4~5	1.3
1.0	0.5	4~5	1.1
2.0	0.5	4~5	0.86~0.88
2.0	1.0	4~5	0.96

a) Protoplasts were prepared from embryogenic callus of *I. batatas* var. White Star.

b) As described in Table 1,b)

c) As described in Table 1,d)



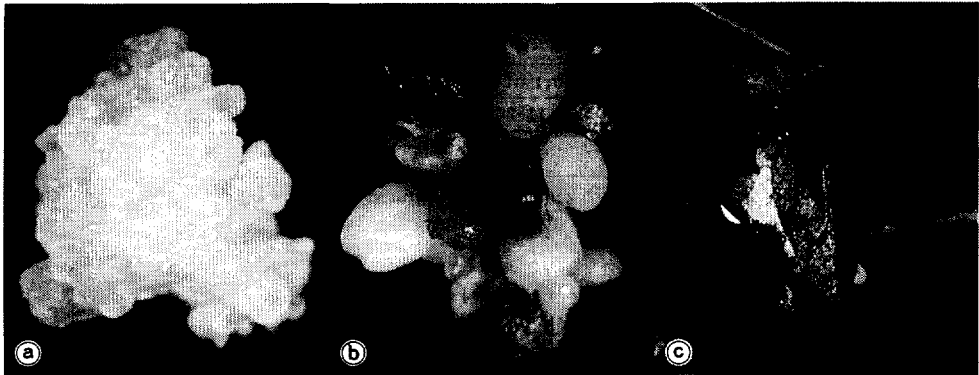


Photo. 2. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *I. batatas* var.

Koganesengan

a) Embryogenic callus.

b) Somatic embryo.

c) Regenerated plant from embryo.

Table 11. Effects of basal medium, 2,4-D and kinetin on the formation of small calli from embryogenic callus-derived protoplasts

Basal medium	Concentration(mg/l)		Frequency of small callus formation (%) <sup>a)</sup>
	2,4-D	kinetin	
LS	0.11	0.11	0.00
	0.11	1.11	0.15
	1.11	0.11	0.00
	1.11	1.11	0.04
Modified LS <sup>b)</sup>	0.11	0.11	0.03
	0.11	1.11	1.75
	1.11	0.11	0.00
	1.11	1.11	0.12

a) Defined as  $\frac{\text{No. of small calli}}{\text{No. of protoplasts plated}} \times 100$

b) Concentrations of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  and  $\text{KNO}_3$  were reduced to 200 and 1,000mg/l, respectively.

微小カルス形成率は修正 LS 培地に、0.11mg/l の 2,4-D、1.11mg/l のカイネチンを添加した培地で最も高かった (第11表)。

#### IV. 考 察

##### 1. 葉身からのプロトプラストの分離

カンショ葉身からのプロトプラスト分離効率を高めるため、OTANI ら<sup>9)</sup>は前処理として

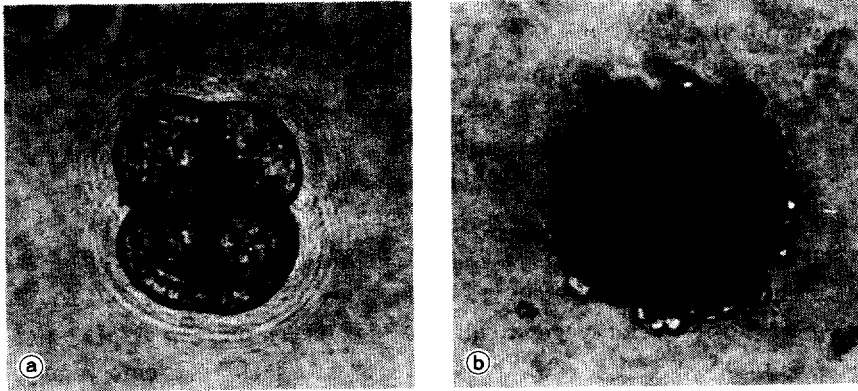


Photo. 3. Culture of protoplasts derived from embryogenic callus of *I. batatas* var. White Star.

- a) Second cell division to produce four daughter cells.  
b) Small callus formation.

葉身の16時間水浸漬処理と酵素組合せについて、福岡<sup>9)</sup>は、酵素処理に先だつソルビトール液への1時間浸漬を検討した。本試験では、セルラーゼ及びペクチナーゼの2種類の酵素を組み合わせることにより、前処理を行わなくともプロトプラストが分離可能であった。しかし、プロトプラスト収量に系統間差異があることを認めた。これは、遺伝子型による葉肉組織の違いが酵素液の組織内への浸透や組織が受ける酵素作用の程度に影響を及ぼすことによると考えられた。

## 2. 葉身由来プロトプラストの分裂・コロニー形成及び不定根分化

葉身由来プロトプラストの初期分裂には、比較的高濃度のカイネチンあるいはゼアチンの添加を必要とすること、コロニー形成にはゼアチンがカイネチンより有効であることが示された。このようなコロニー形成や再分化に対するゼアチンの促進的効果は SIHACHAKK, D and G. DUCREUX<sup>10)</sup>が葉柄由来プロトプラストで、福岡<sup>9)</sup>が葉肉プロトプラストで報告しており、本試験もこれらと同様の結果となった。しかし、高濃度のゼアチンはむしろコロニー形成を抑制することや‘中国37号’のコロニー形成に適する0.5mg/lのゼアチン濃度が‘中支8号’では不適であることが明らかとなった。このことは、品種・系統により最適なゼアチン濃度が異なることを示している。また、本試験で用いた2系統については、コロニーを確実に得るためにゼアチンを0.1mg/l程度の低濃度とすることが望ましいと考えられる。さらに、コロニー形成でみる限り、福岡<sup>9)</sup>が用いた修正 KM8p 培地と、より簡便な修正 MS 培地とに差がみられなかったことから、葉身由来プロトプラスト培養における基本培地の組成の相違はコロニー形成に大きな影響を及ぼさないと判断された。

再分化に際しては、サイトカイニンとしてベンジルアミノプリンを用いたが、不定根は形成されたものの、その後の不定芽の分化は認められなかった。福岡<sup>9)</sup>は再分化培地に添加したサイトカイニンの種類の違いがカルスの性質や再分化に影響を及ぼすこと、ゼアチンがカイネチンより再分化に適することを報告していることからサイトカイニンの種類及

び濃度についての検討が重要であると考えられる。

BELARMINO ら<sup>2)</sup>は、カンショ及びその近縁野生種の葉片カルスから径1-1.5mmの太根を得て、それをホルモンフリーのMS培地で培養することにより、高頻度で不定芽を得た。本試験で得た不定根は比較的太根でこれと類似していることから、不定根の継代培養方法の改善により不定芽を得る可能性は残されている。また、カルスの乾燥処理により再分化率を向上させた報告<sup>1)</sup>もあるため、今後、検討の余地がある。

### 3. embryogenic callus の誘導

CANTLIFFE ら<sup>3)</sup>は‘ホワイトスター’の生長点近傍組織を2.2mg/lの2,4-Dを含む培地で培養し、embryogenic callus を効率よく誘導している。本試験ではこの方法に準じ、多数の品種・系統を用いて embryogenic callus の誘導を行ったが、一部の品種・系統でしかカルスが得られず、その頻度も50%以下であった。また、2,4-D濃度と embryogenic callus の出現頻度との関係は遺伝子型によって異なることを認めた。この原因として、生長点近傍組織の摘出の難易や内生オーキシンの濃度が品種・系統により異なることが考えられる。

### 4. embryogenic callus からのプロトプラストの分離及び培養

酵素組合せや処理時間の違いにかかわらず、葉身に比べ、embryogenic callus から大量のプロトプラストが分離可能であった。このことは embryogenic callus が葉身より分離材料として優れていることを示している。さらに、修正LS培地に低濃度の2,4-D及び高濃度のカイネチンの存在下で、プロトプラストの分裂やその後の増殖が優れることを明らかにしたが、得られた微小カルスを増殖することはできなかった。これに対して福岡<sup>4)</sup>は‘中国25号’の embryogenic callus から分離したプロトプラストをゼアチンを添加したKM8p液体培地で培養し、不定芽や不定胚を得ている。本試験で微小カルスの増殖や植物体の再分化が不可能であった原因として、材料とした embryogenic callus が福岡<sup>4)</sup>の場合と遺伝的に異なること、培地中に添加されたサイトカイニンの違いなどがあげられる。今後、こうした微小カルスの embryogenic callus への分化条件を解明することにより、embryogenic callus 由来プロトプラストからの効率的な再分化技術の確立が可能であるものと考えられる。

## V. 摘 要

1. 葉身由来プロトプラストからのコロニー形成の効率は、ゼアチン添加区がカイネチン添加区より高かったが、好適なゼアチン濃度は系統により異なった。
2. コロニーを増殖して得た小カルスをベンジルアミノプリンを添加した再分化培地で培養した結果、不定根を多数得たが、不定芽の分化は認められなかった。
3. 70品種・系統のうち、11品種1系統の生長点近傍組織から embryogenic callus が得られた。embryogenic callus の出現頻度に及ぼす2,4-D濃度の影響を認めた。
4. Embryogenic callus から、大量のプロトプラストを分離し、寒天培地に包埋して培養することにより、分裂後、微小なカルスを得た。
5. 低濃度の2,4-D及び高濃度のカイネチンを添加した培地において最も高い頻度で微小カルスが形成された。その後カルスはしだいに褐変・枯死あるいは non-embryogenic

callus へと変化し、embryogenic callus の形成には至らなかった。

#### 引用文献

- 1) BIDNEY, D.L. and J.F. SHEPARD : Colony Development from Sweet Potato Petiole Protoplasts and Mesophyll cells. *Plant Science Letters* **10** : 335-342, 1980.
- 2) BELARMINO, M., T. ABE and T. SASAHARA : Variation in Plant Regeneration from Leaf Calli of *Ipomoea batatas* and its related species. *Japan J. Breed.* **41** (Suppl.) : 306-307, 1991.
- 3) CANTLIFFE, D.J., J.R. LIU and J.R. SCHULTHEIS : Development of Artificial Seeds of Sweet Potato for Clonal Propagation through Somatic Embryogenesis, In, Methane from biomass, a system approach, Smith, R.H. and Frank, J.R. (Eds.), pp. 229~236, Elsevier Applied Science, New York, 1987.
- 4) 福岡壽夫：試験管内受精利用によるかんしょの不和合性打破技術の開発。農林水産業特別試験研究費補助金による研究報告書。pp. 39, 1991.
- 5) 小巻克巳, レイモンド・シー, ダニエル・カントリフ：フロリダ大学におけるかんしょ人工種子の開発。農業技術 **64** : 204~207, 1989.
- 6) LINSMAIER, E. and F. SKOOG : Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* **10** : 100-127, 1965.
- 7) MURASHIGE, T. and F. SKOOG : A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* **15** : 473-497, 1962.
- 8) MURATA, T., K. HOSHINO and Y. MIYAJI : Callus Formation and Plant Regeneration from Petiole Protoplasts of Sweet Potato, *Ipomoea batatas* (L.). *Japan J. Breed.* **37** : 291-298, 1987.
- 9) OTANI, M., T. SHIMADA and H. NIIZEKI : Mesophyll Protoplast Culture of Sweet Potato (*IPOMOEA BATATAS* L.). *Plant Science* **53** : 157-160, 1987.
- 10) SIHACHAKR, D. and G. DUGREUX : Plant Regeneration from Protoplasts Culture of Sweet Potato (*Ipomoea batatas* Lam.). *Plant Cell Reports* **6** : 326-328, 1987.
- 11) 須賀立夫・高木嘉明・奥津喜章：サツマイモおよび近縁野生種のプロトプラストの培養——近縁野生種における植物体の再生。育雑 **40** (別1), 1990.
- 12) VASIL, V., F. REDWAY and I.K. VASIL : Regeneration of Plants from Embryogenic Suspension Culture Protoplasts of Wheat (*TRITICUM AESTIVUM* L.). *Bio/Technology* **8** : 429-434, 1990.
- 13) VASIL, I.K. and V. VASIL : Isolation and Culture of Protoplasts. *International Review of Cytology*, Supplement **11B** : 1-19, 1980.

## Formation of Calli and Adventitious Roots from Mesophyll- and Embryogenic Callus-Derived Protoplasts of Sweetpotato, *Ipomoea batatas* (L.) LAM.

Masaru YOSHINAGA and Katsumi KOMAKI<sup>1)</sup>

### Summary

To apply the techniques of cell fusion and gene transfer including electroporation to sweetpotato, *Ipomoea batatas* (L.) LAM., it is needed to establish a reliable method for protoplast culture and plant regeneration. Some experiments were performed on the isolation and culture of protoplasts from mesophyll cells as well as from embryogenic callus. Colony formation from mesophyll protoplasts was observed after 50 days of culture in Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 0.1 mg/l and 0.5 mg/l of zeatin. Zeatin proved to be superior to kinetin because it induced continuous cell division and colony formation. The colonies grew into micro-calli of 2-3 mm in diameter within two months after plating. Adventitious roots were formed on the micro-calli in all combinations of growth regulators. However, no shoot morphogenesis occurred on the micro-calli.

The concentrations of 2,4-D influenced the occurrence of embryogenic calli from shoot apices of 70 genotypes. The effects of 2,4-D varied among the genotypes. Sufficient numbers of protoplasts could be obtained from embryogenic callus of *I. batatas* var. White Star. Successive cell division of these protoplasts resulted in the formation of small calli. Low 2,4-D and high kinetin concentrations favoured small calli formation. However, they failed to grow and produce regenerated plants under these conditions.

---

Department of Upland Farming, Kyushu National Agricultural Experiment Station, MAFF, Miyakonojo, Miyazaki, 885 Japan.

1) Secretariate, Ministry of Agriculture and Forestry and Fisheries.