

ダイジョ (*Dioscorea alata* L.) の組織培養 によるマイクロチューバ形成

飯島 健*・山崎裕美***・真田篤史**・駒嶺 穆****・藤巻 宏*,**・豊原秀和*,**

(平成 20 年 5 月 8 日受付/平成 20 年 9 月 2 日受理)

要約: ダイジョ (*Dioscorea alata* L.) の地方品種 'Nani Niyaka' を無菌培養した植物の節部切片培養を行い、マイクロチューバ (MT) 形成に及ぼす植物成長調節物質、培地の種類、培地のショ糖濃度、ならびに照明時間の効果について検討した。その結果、NAA, ABA, KIN および PDJ など 4 種類の植物成長調節物質は、MT 形成に顕著な効果を示さなかった。特に NAA と PDJ は MT 形成に抑制する傾向が見られた。3 種類の基本培地、4 水準の照明時間、5 水準のショ糖濃度について実験を行った結果、MS 培地に 10% 程度のショ糖を添加し、16 時間照明で培養するのが MT 形成に最も効果的であることが分かった。ダイジョの MT 形成には、培養植物体内の炭水化物が必要と考えられる。培地の窒素の種類と濃度が MT 形成に影響し、窒素成分に富む培地で MT 形成が促進された。これらの結果から、植物体内の炭水化物と窒素の絶対量が MT 形成の促進要因となっていると考えられる。

キーワード: ヤムイモ, マイクロチューバ, 照明時間, ショ糖濃度, 植物成長調節物質

緒 言

ダイジョ (*Dioscorea alata* L.) はヤムイモの一種で、アジア、アフリカ、中南米および太平洋諸島の熱帯を中心に広く分布し、アジアやアフリカの一部の地域では、主食料として栽培・利用されている¹⁾。通常、ダイジョは塊茎による栄養繁殖が行われる。しかし、1 株に 1~数個しか塊茎を着生しないため極端に増殖効率が低く²⁾、収穫物の 20% 程度を種イモとする必要がある³⁾。また、栄養繁殖に伴うウイルス病の拡大も深刻な問題である。したがって、ダイジョの組織培養を活用したウイルスフリー種苗の生産ならびにマイクロチューバ (MT) などの無菌培養体を活用する効率的な種苗増殖技術の開発が求められている。さらに、後者は、遺伝資源の保全にも重要な役割を果たすと考えられる。

そこで、本研究では、ダイジョの MT 形成による効率的な増殖技術の開発をめざして、植物成長調節物質、培地の種類、培地のショ糖濃度、ならびに照明時間が MT 形成に及ぼす影響を検討し、その効果を明らかにした。

材料および方法

1) 材料と培養条件

ダイジョ (*Dioscorea alata* L.) のパプアニューギニア地方品種 'Nani Niyaka' を温室で栽培し、十分伸長した側枝から蔓を採取した。外植体は、葉を除去した後中性洗剤で

洗浄し、70% エタノールに数秒間浸し、展着剤としてツイーン 20 を数滴添加した有効塩素 0.5% の次亜塩素酸ナトリウムに 10 分間浸漬して滅菌した。滅菌水で 3 回洗浄後、実体顕微鏡下で節部切片から葉原基 1 から 2 枚を含んだ 0.5 mm の大きさの茎頂を切り出し、ショ糖 3% を加えた MS 培地に置床し、温度 28°C、照明 16 時間の培養条件下で 3 ヶ月間培養した植物体から各試験に供試する節部切片を切り出した。いずれの実験においても、培地には gellan gum を 0.2% 添加した。培地は直径 25 mm、高さ 120 mm の試験管に 10 ml ずつ分注し、アルミ фольドで 2 重に密栓した後に、オートクレーブで 15 分間加圧滅菌して用いた。培養は、温度 28°C、光合成有効光子束密度 (PPFD) 58.8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の人工気象器内で 6 ヶ月間行った。

2) 植物成長調節物質の効果検討のための培養

葉を切り落とした 1 cm 程度の単節の節部切片を試験管ごとに 1 切片を植付け、処理区あたり 10 切片を供試した。植物成長調節物質として、 α -naphthaleneacetic acid (NAA), kinetin (KIN), abscisic acid (ABA) およびジャスモン酸誘導体 n-propyldihydrojasmonate (PDJ) を用いた。ショ糖 3% を添加した Murashige & Skoog (MS) 培地⁴⁾に、NAA (0, 0.5 mg l^{-1}), KIN (0, 0.5 mg l^{-1}), ABA (0, 0.25 mg l^{-1}) を組み合わせて添加し、温度 28°C、8 時間照明下で培養を行った。さらに、MS 培地に高濃度のショ糖 (10%) を添加した培地を用い、NAA (0, 0.5 mg l^{-1}) および PDJ

* 東京農業大学大学院農学研究科

** 東京農業大学国際農業開発学科

*** 元東京農業大学国際農業開発学科

**** (財)進化生物学研究所

(0, 1, 10, 100 μ M) を組み合わせて添加した処理区を設け、16 時間照明下で培養した。

3) ショ糖濃度、照明時間ならびに培地の検討のための培養

基本培地として、MS 培地、硝酸アンモニウム (NH_4NO_3) を除いた修正 MS 培地、および White 培地を用いた。各培地にショ糖を 3, 8, 10, 12, 15% 添加した。本実験では植物成長調節物質は用いず、培養は 28°C で行い、照明時間を 0, 8, 16, 24 時間に設定した。3 種類の培地、ショ糖濃度 5 水準、照明時間 4 水準を組み合わせた 60 処理区設けた。試験管あたり節部切片 1 個を置床し、処理区あたり 15 本の試験管を用いた。6 ヶ月間培養し MT 形成状況を調査した。処理区ごとに 15 本の試験管に形成された MT の総数をベースにした三元配置の分散分析を行い、処理区の平均値の差異は、最小有意差 (LSD) を用いて統計的検定を行った。

結果および考察

1) 植物成長調節物質が MT 形成に及ぼす影響

本実験では、MT は培養植物体の葉腋部に 0~1 個形成された。培地に植付けた単切片の葉腋部から萌芽し 3 ヶ月程度経過し、茎が数節伸長した頃に葉腋部に赤みを帯びた球体が形成され、6 ヶ月程度経つと図 1 に示すような小塊茎が形成された。

ショ糖を 3% 添加した 8 時間照明では、NAA+ABA 添加区で 10 本中 2 本の試験管、NAA 添加区では 1 本の試験管で、それぞれ 1 個ずつの MT が形成された (表 1)。KIN 添加区では、NAA, ABA の有無に関わらず MT 形成はみられなかった。すなわち、NAA 添加、KIN 無添加区でのみ MT 形成がみられた。

一方、*D. bulbifera* L., *D. rotundata* Poir. および *D. alata* L. では、KIN 添加培地で MT が形成されることが報告されている⁵⁻⁷⁾。本実験で異なる結果となったのは、用いた濃度の KIN は、シュートの形成や発育を促進したため、シュート形成と成長が MT 形成よりも優先して起こり、培地中に MT 形成に必要な炭素化合物が不足し MT が形成されなかったと考えられる。したがって、より高濃度のショ糖を用いれば、MT が形成されることが考えられる。また、ショ糖 10%, 16 時間照明で NAA および PDJ の影響を調べた。その結果、0.5 mg l^{-1} の NAA 濃度では、その有無にかかわらず MT 形成がみられ、NAA の添加により、MT 率は低下した (表 2)。さらに、PDJ を添加すると明らかに MT 形成率が低下した (表 2)。

ALIZADEH ら⁸⁾ によれば、*D. composita* Hemsl. では、ショ糖 8%, 16 時間照明下では、5 μ M の NAA と IAA を添加した場合に、MT 形成が著しく促進された。さらに、BAZABAKANA ら⁹⁾ によれば、ダイジョでは、ショ糖 3%, 16 時間照明下で、10 μ M のジャスモン酸の添加が MT 形成に有効とされた。

以上のように、本実験で用いたダイジョでは KIN および PDJ は MT 形成にむしろ抑制的にはたらくことが明らかとなった。ここで用いた濃度では、NAA の効果は明らか

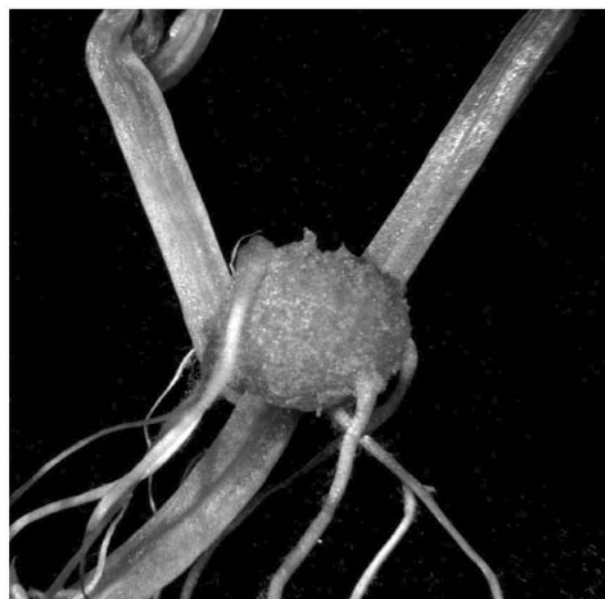


図 1 葉腋部に形成されたマイクロチューバ

表 1 ショ糖 3%, 8 時間照明条件下における、NAA, ABA, KIN の添加が MT 形成に及ぼす効果

NAA (mg l^{-1})	ABA (mg l^{-1})	KIN (mg l^{-1})	形成率* (%)	処理区内の 総形成数*
0	0	0	0	0
0	0.25	0	0	0
0	0	0.5	0	0
0	0.25	0.5	0	0
0.5	0	0	10	1
0.5	0.25	0	20	2
0.5	0	0.5	0	0
0.5	0.25	0.5	0	0

*1処理区 (試験管10本) あたりの形成率および総形成数

表 2 ショ糖 10%, 16 時間照明条件下における、NAA, PDJ の添加が MT 形成に及ぼす効果

NAA (mg l^{-1})	PDJ (μ M)	形成率* (%)	処理区内の 総形成数*
0	0	100	19 a
0	1	90	17 a
0	10	0	0 b
0	100	0	0 b
0.5	0	70	11 ac
0.5	1	60	8 c
0.5	10	50	6 c
0.5	100	0	0 b

*1処理区 (試験管10本) あたりの形成率および総形成数
注) 異なるアルファベットを付した数値は1%水準で有意

でなく、むしろ無添加で MT 形成率が高まった。これらの結果が既報のダイジョの近縁種における MT 形成条件と異なるのは、種間あるいは品種間差のためと考えられる。

表 3 ショ糖濃度、照明時間ならびに培地の種類が MT 形成に及ぼす効果

ショ糖濃度 (%)	照明時間 (h)	マイクロチューバ総形成数*		
		MS培地	修正MS培地	White培地
3	0	0	0	0
3	8	0	1	0
3	16	2	0	2
3	24	0	0	1
8	0	1	3	3
8	8	7	6	2
8	16	14	9	3
8	24	16	7	0
10	0	7	4	1
10	8	14	7	0
10	16	21	8	0
10	24	12	4	0
12	0	8	1	1
12	8	15	1	0
12	16	9	1	0
12	24	11	0	0
15	0	2	0	0
15	8	0	0	0
15	16	3	0	0
15	24	0	0	0

*1処理区（試験管15本）から得られた総数

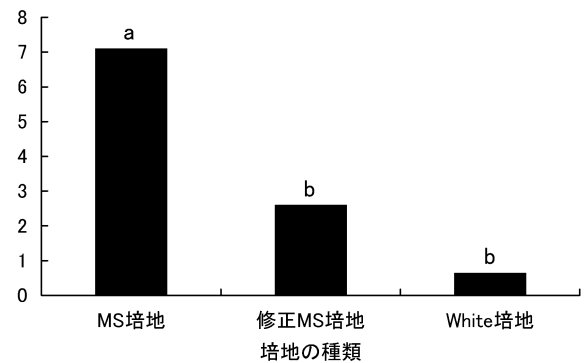
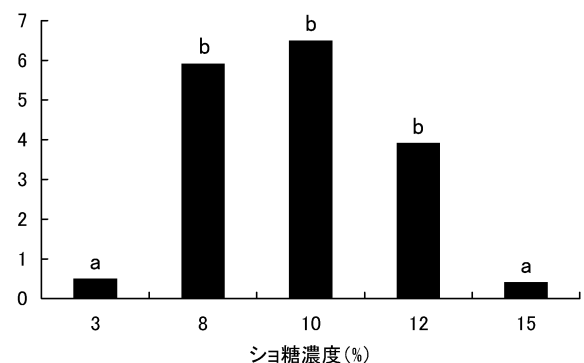
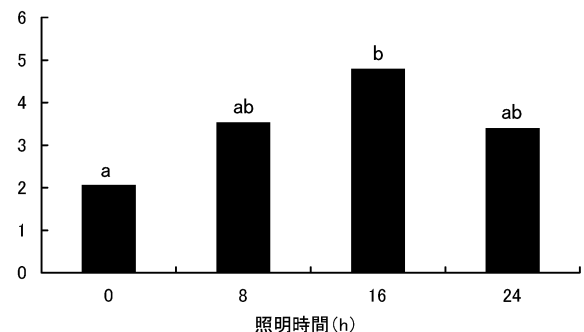
表 4 ショ糖濃度、照明時間ならびに培地の種類が MT 形成に及ぼす効果についての分散分析表

因子	平方和	自由度	平均平方	F値	P値	判定
培地種類	437.7	2	218.850	41.852	0.000	**
照明時間	56.2	3	18.728	3.571	0.029	*
ショ糖濃度	402.1	4	100.525	19.224	0.000	**
培地×照明	58.2	6	9.694	1.854	0.131	
培地×ショ糖	315.3	8	39.413	7.537	0.000	**
照明×ショ糖	83.9	12	6.992	1.337	0.262	
誤差	125.5	24	5.229			
全体	1478.9	59				

注) **および*はそれぞれ1%と5%水準で有意

2) ショ糖濃度、照明時間ならびに培地の違いが MT 形成に及ぼす影響

培地の種類とショ糖濃度が MT 形成にどのように影響するかを調べるため、表 3 に示す条件で実験を行った。表に処理区ごとの MT 形成数を示した。培地 3 種類、ショ糖濃度 5 水準、照明時間 4 水準を組み合わせた三元配置実験の 60 区のデータの分散分析を行った結果を表 4 に示す。すなわち、培地の種類とショ糖濃度の主効果は 1% 水準、照明時間の主効果は 5% 水準で有意となり、培地×ショ糖の交互作用は 1% 水準で有意となった。培地の種類に関しては、MS 培地で最も MT 形成数が多く、修正 MS 培地と White 培地の順で MT 形成数は少なかった（図 2）。ショ

図 2 異なる培地における MT 平均形成数
異なるアルファベットを付した処理間には 1% 水準で有意図 3 異なるショ糖濃度における MT 平均形成数
異なるアルファベットを付した処理間には 1% 水準で有意図 4 異なる照明時間における MT 平均形成数
異なるアルファベットを付した処理間には 1% 水準で有意

糖濃度に関しては、10% で MT 形成数が最も多く、それよりもショ糖濃度が高くても低くても形成数は減少した（図 3）。照明時間については、16 時間で最も多くの MT が形成され、それより長くても短くても MT 形成が低下した（図 4）。培地の種類とショ糖濃度の交互作用は、培地の種類により有効ショ糖濃度が異なり、MS 培地では 10%、修正 MS 培地と White 培地では 8% を境に MT 形成数が減少する結果となった（図 5）。すなわち、培地の種類によりショ糖の添加効果が著しく異なることが分かった。

JEAN ら¹⁰⁾ は、ダイジョにおいて、MS 培地にショ糖 4% で、16、24 時間照明が MT 形成に効果があるとしており、本研究と同様の傾向が見られた。MANTELL ら⁷⁾ は、ダイ

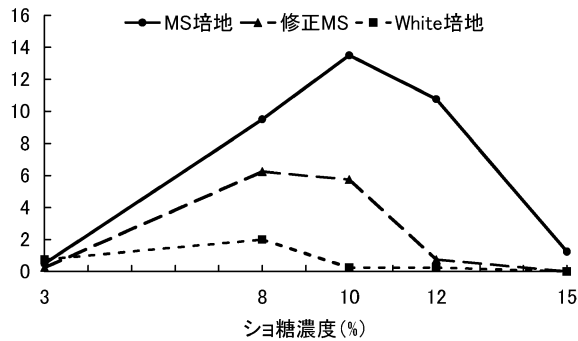


図 5 培地の種類とシュ糖濃度の交互関係

ジョにおいて、8時間照明で、T培地にシュ糖2%、4%、8%の濃度でシュ糖を添加した場合、2%でMT形成に効果があるとしている。窒素含有量はMS培地、修正MS培地、White培地、T培地の順で少なくなっており、有効なシュ糖濃度も培地の窒素含有量に伴って低くなると考えられる。本実験では、シュ糖が12%あるいは15%と高濃度になると、MT形成数は減少した。このことから、窒素含有量と、窒素源、有効シュ糖濃度についても検討が必要である。

本研究で供試したダイジョ品種 Nani Niyaka のMT形成には植物成長調節物質の効果は認められず、シュ糖濃度と照明時間がMT形成に影響することが分かった。しかし、本実験ではMT形成に6ヶ月要しており、実用水準にまで増殖効率を高めるには、さらにMT形成に要する期間を短縮する条件の検討が必要と考えられる。また、MS培地に10%のシュ糖を加え16時間照明で培養すると、最も効率よくMTが形成されることが明らかとなった。上記条件が他の品種においても効果的にMT形成を誘導できるか否かについて、今後検討する必要がある。

参考文献

- 1) 豊原秀和, 1998. パプアニューギニアにおけるヤマイモ (*Dioscorea alata* L.) の品種, 生態学的研究. 東京農業大学博士學位論文: 101-137.
- 2) ONWUEME, I.C. 1978. The tropical tuber crops : yams, cassava, sweet potato, and cocoyams. John Wiley : 1-14.
- 3) OKOLI, O.O. and M.O. AKORODA 1995. Providing seed tubers for the production of food yams. *African J. of Root and Tuber Crops* 1 (1) : 1-5.
- 4) MURASHIGE, T. and F. SKOOG 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15 (3) : 473-497.
- 5) UDUEBO, A.E. 1971. Effect of external supply of growth substances on axillary proliferation and development in *Dioscorea bulbifera*. *Ann. Bot.* 35 (1) : 159-163.
- 6) NG, S.Y.C. 1988. In vitro tuberization in white yam (*Dioscorea rotundata* Poir). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 14 (2) : 121-128.
- 7) MANTELL, S. and S. HUGO 1989. Effects of photoperiod, mineral medium strength, inorganic ammonium, sucrose and cytokinin on root, shoot and microtuber development in shoot cultures of *Dioscorea alata* L. and *D. bulbifera* L. yams. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 16 (1) : 23-37.
- 8) ALIZADEH, S., S. MANTELL and A.V. MARIA 1998. In vitro shoot culture and microtuber induction in the steroid yam *Dioscorea composita* Hemsl. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 53 (2) : 107-112.
- 9) BAZABAKANA, R., M.L. FAUCONNIER, B. DIALLO, P.J. DUPONT, J. HOMES and M. JAZIRI 1999. Control of *Dioscorea alata* microtuber dormancy and germination by jasmonic acid. *Plant Growth Regulation* 27 (2) : 113-117.
- 10) JEAN, M. and M. CAPPADOCIA 1991. In vitro tuberization in *Dioscorea alata* L. 'Brazo fuerte' and 'Florido' and *D. abyssinica* Hoch. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 26 (3) : 147-152.

Microtuberization by Tissue Culture of Greater Yam (*Dioscorea alata* L.)

By

Ken IJIMA*, Hiromi YAMAZAKI***, Atsushi SANADA**, Atsushi KOMAMINE****,
Hiroshi FUJIMAKI*,** and Hidekazu TOYOHARA*,**

(Received May 8, 2008/Accepted September 2, 2008)

Summary : This study aims at finding factors affecting microtuberization of greater yam (*Dioscorea alata* L.). None of four plant growth regulators, NAA, ABA, kinetin and PDJ, were promotive to form microtubers. The MS medium adding 10% sucrose under 16 hours illumination remarkably promoted to form microtubers. But NAA and PDJ tended to inhibit tuberization. The three-way arrangement experiments with three different culture media, five levels of sucrose concentration, and four levels of illumination time were conducted and disclosed that tuberization was the most active on the MS medium with the addition of 10% sucrose under 16 hours period of illumination a day. The essential to microtuberization of greater yam is considered to be the concentration of carbohydrate in cultured plants. Sources and concentrations of nitrogen in the culture media affected the formation of microtubers. Nitrogen-rich media promoted microtuberization.

Key words : *Dioscorea alata*, microtuber, photoperiod, sucrose concentration, tissue culture

* Graduate School of Agricultural Sciences

** Department of International Agricultural Development, Tokyo University of Agriculture

*** Former Student, Department of International Agricultural Development, Tokyo University of Agriculture

**** Institute of Evolutional Biology