

トマト野生種 (*Lycopersicon glandulosum*) 葉肉プロト プラストからの植物体再生

佐藤正紀*・小岩井晃**・長尾照義***

* 日本たばこ産業株式会社植物開発研究所
(〒323 栃木県小山市大字出井 1900)

** 日本たばこ産業株式会社生命科学研究所
(〒227 神奈川県横浜市緑区梅が丘 6 番 2)

*** 井関農機株式会社筑波研究所
(〒300-03 茨城県稲敷郡阿見町大字阿見 4818)

(1988年9月9日受付)

(1989年7月21日受理)

1. 緒 言

細胞融合や遺伝子組換えによる形質転換を進めてゆく上で、プロトプラスト培養系を確立することは重要なことである。トマト (*Lycopersicon*) 属については、プロトプラストからの植物体再生の報告が多くあるが、*L. glandulosum* についてはまだ報告がない。*L. glandulosum* は、TMV 抵抗性や耐病性^{1,2)}を持つものの自然条件下で栽培種との交配は非常に困難である。著者らはこの有用形質を細胞融合により栽培種に導入することを目的として、*L. glandulosum* のプロトプラストを単離し培養を試み、プロトプラスト由来の再生植物を得ることができたので報告する。

2. 材料および方法

(1) プロトプラストの単離

プロトプラストの単離には、播種後 50~60 日後の温室で生育した *L. glandulosum* の、十分に展開した葉を用いた。これらの葉をオスバン 100 倍希釈液に 30 秒間、さらに 70% エタノールに数秒間浸漬した後、Tween 20 を数滴含む有効塩素 0.5% アンチホルミンに 10 分間浸漬して滅菌処理を行った。滅菌水で 3 回洗浄した後、葉を 2 mm 幅に細断し、0.5% マセロザイム R-10、2.0% セルラーゼオノズカ R-10、5 mM 塩化カルシウム、8.0% マンニトールを含む酵素液 (pH 5.8) に浸し、28°C 暗黒下に 12 時間静置した。処理後二重のガーゼで濾過し、300 rpm で 30 秒間遠心し、沈降したプロトプラストを 5 mM の塩化カルシウムを含む 8.0% マンニトール液で 3 回洗浄した後、培養に供した (Fig. 1a)。

(2) プロトプラストの培養

培養は直径 6 cm のプラスチックシャーレに 5 ml の培養液中、 1×10^5 個の密度でプロトプラストを入れ、パラフィルムで密封後、28°C 16 時間照明 (約 1,300 lux) の条件で行った。培養には、KM-8P 培地³⁾、TM-2 培地⁴⁾、MS 培地⁵⁾を基本として、それぞれに NAA 2.0 mg/l、BAP 1.0 mg/l を加え、8.0% のマンニトールで浸透圧を調整した培地と、8E 培地 (マンニトール 8.0%)⁶⁾ にグルタミン 250 mg/l を加えた培地を用いた。

3. 結果と考察

単離した *L. glandulosum* のプロトプラストを、アンモニア態窒素を含む、KM-8P、TM-2、MS を基本とする培地で培養した場合はすべて凝集褐変した。アンモニア態窒素を全く含まず、グルタミンを添加した 8E 培地 (IAA 1.0 mg/l、2,4-D 1.0 mg/l、BAP 1.0 mg/l) で初期分裂が認められた。また、この 8E 培地においても、その後の分裂は停止し枯死に至った。そこでこの 8E 培地を基本として、そのホルモン条件について検討したところ、NAA 0.5 mg/l、BAP 0.5 mg/l 添加した区で最も旺盛にクラスターの形成が認められた (Table 1, Fig. 1b, 1c)。以後の実験はこの培地組成を用いて行った (修正 8E 培地)。しかし、培養 10 日を過ぎると褐変化が認められ、栄養不足の様子を呈したので、次の実験では培養 7 日後に新しい同一の培地をさらに添加した。その結果、褐変化は起こらず培養 14 日後には、直径 1~1.5 mm のコロニーにまで生長した。

次に *L. glandulosum* の葉肉外植片からのシュート

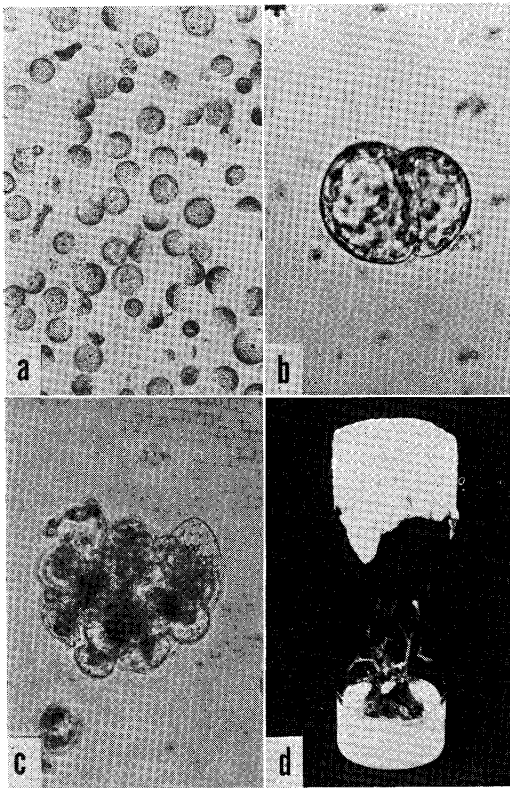


Fig. 1. a : freshly isolated protoplasts of *Lycopersicon glandulosum*, b : first division of a protoplast, c : Colony formation from protoplast, d : plantlet formation obtained from a protoplast.

分化のホルモン条件について検討した。MS 固体培地 (寒天 0.8%) に zeatin, NAA, IAA を各種組み合わせで添加し、16 時間照明下 (約 1,300 lux) 28°C で培養した。その結果、zeatin 1.0 mg/l 単独添加区でシュートの形成が最もよかった (Table 2)。そこでこの培地をプロトプラスト由来のカルスからシュートを分化させるための再分化培地として用いることとした。

次にプロトプラスト由来コロニーの増殖条件について検討した。プロトプラストの液体培養に用いた修正 8E 培地に寒天を 0.4% 添加した固体培地 (medium A) と medium A のマンニトール濃度を半分 (4.0%) に減じた 0.4% 寒天培地 (medium B)、および外植片からのシュート分化が良好であった再分化培地に 8.0% のマンニトールを加えて浸透圧を調整した 0.4% 寒天培地 (medium C) の計 3 種の培地に、修正 8E 液体培地で生育したコロニーを移植した。その結果、約 1 カ月後には medium B で最も旺盛に増殖しカルスを形成した。medium A

Table 1. Effect of hormone combinations on colony formation in protoplast culture.

Hormone (mg/l)				Colony formation ^a
NAA	IAA	2,4-D	BAP	
—	1.0	1.0	1.0	—
0.5	—	0.5	0.5	+
2.0	—	0.5	1.0	+
2.0	—	—	1.0	++
0.5	—	1.0	0.5	+
0.5	—	—	0.5	+++

Basal medium : Mineral salt and vitamins of 8E + glutamine 250 mg/l.

^a — : no, + : slight, ++ : moderate, +++ : vigorous.

Table 2. Effect of hormone combinations on shoot, callus and root formations in leaf explant culture.

Hormone (mg/l) ^a				Response		
Zeatin	NAA	IAA		Shoot	Callus	Root
0.2	—	—		+	++	—
1.0	—	—		+++	++	—
2.0	—	—		++	++	—
0.2	1.0	—		—	+++	+
1.0	2.0	—		—	++	+
2.0	4.0	—		—	+	—
0.2	—	1.0		—	+	—
1.0	—	2.0		—	+	—
2.0	—	4.0		—	+	—

^a Various concentrations of hormones were added to MS basal medium (pH 5.8, 0.8% agar).

Table 3. Effect of some media on callus growth from the colony of protoplast.

Culture media (0.4% agar)	Callus growth
Medium A	++
Medium B	+++
Medium C	—

Medium A : Modified 8E medium (mannitol 8.0%).
Medium B : Modified 8E medium (mannitol 4.0%).
Medium C : MS medium + zeatin 1.0 mg/l (mannitol 8.0%).

でも medium B よりやや劣るもののカルスの形成が認められたが medium C ではコロニーの増殖は認められなかった (Table 3)。

次に medium A, B によって得られたカルスからシュートを誘導するために、再分化培地に移す際のマンニト

Table 4. Effect of mannitol concentrations on shoot formation from the protoplast-derived calli.

First culture (0.4% agar)	Mannitol concentration (%) in shoot formation medium		No. of shoots from colony
	First subculture (0.8% agar)	Second subculture (0.8% agar)	
Medium A (mannitol 4.0%)	4.0	4.0	0
	3.0	0.0	3
	2.0	0.0	1
	0.0	0.0	17
Medium B (mannitol 8.0%)	3.0	0.0	0
	2.0	0.0	7
	0.0	0.0	11

ール濃度の減じ方について検討した。medium A または B で生育したプロトプラスト由来のカルスをも、マンニトール 0~4.0% を含む培地に移植し (first subculture) 4 週間培養後、マンニトールをまったく含まない培地、もしくは 4.0% を含む培地に移植し (second subculture) 培養を続けた (Table 4)。その結果、medium A より得られたカルスをただちにマンニトールを全く含まない培地に移植した場合に最もシュートの形成が良好であった。マンニトール濃度を順次下げていった場合でも移植を重ねることによってシュートの形成は認められたが、その形成能は劣っていた。

このようにして得られたシュートは、ホルモンフリーの MS 固体培地 (寒天 0.8%) に移植することによって、約 2 週間後には発根し、完全な植物体となった (Fig. 1d)。プロトプラストの単離から完全な植物体となるまでには約 4 カ月を要した。馴化後、鉢上げして得られた 10 個体の植物体の根端細胞を用いて染色体の数を調べたところ、6 個体は母植物と同じ二倍体 ($2n=24$) であったが、4 個体は四倍体になっていた。トマト野生種 *L. peruvianum* は、栽培種 *L. esculentum* に比べて高い再分化能をもつことが知られている⁷⁾。本研究において *L. peruvianum* の近縁種 *L. glandulosum* も、高い再分化能をもつことが示された。

トマトのプロトプラスト培養では、数回サブカルチャーを行うことが再分化には効果的であることが知られて

いる^{8,9)}。その際のマンニトール濃度 (浸透圧) の減じ方については、サブカルチャーの過程において段階的に減じている場合が多い。しかし今回の実験では、初期培養と同程度のマンニトール濃度で、ある一定の大きさまで生長したカルスを、いきなりマンニトールを除いた培地で培養した場合に最もシュート形成が旺盛であった。プロトプラストから植物体再生を行う場合には、マンニトール濃度の影響は大きいものと考えられる。

文 献

- 1) Varma, J. P., J. Hayati, Poonam, 1980. Z. Pfl-Krankh. PflSchutz., **87**: 137-144.
- 2) Ammati, M., I. J. Thomason, H. E. McKinney, 1986. J. Nematol., **18**: 491-495.
- 3) Kao, K. N., N. R. Michayluk, 1975. Planta, **126**: 105-110.
- 4) Shahin, E. A., 1985. Theor. Appl. Genet., **69**: 235-240.
- 5) Murashige, T., F. Skoog, 1962. Physiol. Plant., **15**: 473-497.
- 6) Zepata, F. J., K. C. Sink, E. C. Cooking, 1981. Plant Sci. Lett., **23**: 41-46.
- 7) Zepata, F. J., P. K. Evans, J. B. Power, E. C. Cooking, 1977. Plant Sci. Lett., **8**: 119-124.
- 8) Kobliz, H., D. Kobliz, 1982. Plant Cell Rep., **1**: 143.
- 9) Kobliz, H., D. Kobliz, 1982. Plant Cell Rep., **1**: 147.

Summary

Plant Regeneration from Leaf Mesophyll Protoplasts of *Lycopersicon glandulosum*

Seiki SATO,* Akira KOIWA** and Teruyoshi NAGAO***

* *Applied Plant Research Laboratory, Japan Tobacco Inc., 1900 Idei,
Oyama, Tochigi 323, Japan*

** *Life Science Research Laboratory, Japan Tobacco Inc., 6-2 Umegaoka,
Midori-ku, Yokohama, Kanagawa 227, Japan*

*** *Iseki Co. and Ltd., Tsukuba Research Center R and D., 4818 Ami-machi,
Inashiki-gun, Ibaraki 300-03, Japan*

Mesophyll protoplasts isolated from *Lycopersicon glandulosum* were cultured in the modified 8E liquid medium. These protoplasts were divided after 5 days of culture. When the fresh liquid medium was added to the culture on the 7th day, the protoplasts continued to divide for 14 days to form colonies. These colonies were transferred to the modified 8E agar medium, then transferred again to MS agar medium containing 1.0 mg/l zeatin to induce shoots. The induced shoots finally developed into intact plants on MS hormone-free agar medium.