

トマト (*Lycopersicon esculentum*) の子葉 プロトプラストの培養と基本培地

今西 茂・須藤由美・遠藤尚美・樋浦 巖
(山形大学農学部園芸繁殖学研究室)

Effect of basal media on the cell division, colony formation
and plant regeneration from cotyledon
protoplast in *Lycopersicon esculentum*

Shigeru IMANISHI, Yumi SUTO, Naomi ENDO and Iwao HIURA
(Laboratory of Horticultural Breeding and Propagation,
Faculty of Agriculture, Yamagata University)

緒 論

トマトではバレイショのプロトプラストと組み合わせてポマトという体細胞雑種植物が育成された¹⁾。しかし、トマト単独のプロトプラストからの植物体再生は長く困難であった。ようやく、1980年代になって成功例が報告されるようになったにすぎない²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾。しかし、それらの場合は、再現性が乏しい、特定の系統である、再分化までに3~4ヶ月の長期培養を要する、などの問題点をかかえていた。

最近になり約40日という短期間の培養にもかかわらず、多数の品種や系統において、高い再現性で植物体を還元できる結果が報告された⁶⁾。本報告は、その研究を検証するために、そこで用いられた培地を他の3種の培地と比較検討し、植物体を再生させた結果である。

材料と方法

トマトの品種として強力東光を用いた。材料の養成やプロトプラストの単離と培養は、IMANISHI & HIURA (1982)⁷⁾の場合とほぼ同様の方法で行なった。その概要をTable 1に示す。しかし、プロトプラストの初期培地にTM-2培地を用いた場合には、材料の養成は100 ml 三角フラスコのTM-1寒天培地で無菌発芽させて行なった。プロトプラストからコロニーが形成された後の培養は結果の項で述べる。

結果と考察

プロトプラストの培養後の経過と結果の概要をTable 2と3に示す。MS培地¹⁰⁾でも、プロトプラストが分裂する場合はあるが、分裂率が低く、すぐ褐変化してコロ

Table 1. Conditions of isolation of protoplast

Basal ⁽¹⁾ medium	Growth conditions of plant material			Part of plant used for isolation of protoplast	Sterilization of cotyledon	Percentage of enzyme mixture			Time of enzyme treat- ment
	Temp.	Intensity of light	Length of day			Meicelase P	Macerozyme	Driselase	
MS	20°C	2,500 lux	16 days	Cotyledon	Sterilized	2.0%	0.2 %	—	16 hr.
R9	do.	do.	do.	do.	do.	do.	do.	—	18 hr.
8E	do.	do.	do.	do.	{Aseptically grown do.	do.	do.	0.01%	10 hr.
TM-2	do.	do.	do.	do.		2.5%	0.25%	0.08%	13 hr.

(1) MS : MURASHIGE & SKOOG (1962)⁽¹⁰⁾
8E : ZAPATA et al. (1981)⁽⁹⁾

R9 : MORGAN & COCKING (1982)⁽⁸⁾
TM-2 : SHAHIN (1985)⁽⁶⁾

[1985年10月31日受理]

本報告の一部は日本育種学会昭和60年度秋季大会で発表した。

ニーを形成させることは困難であった。R9 培地⁹⁾では、種後10日の子葉を用いると、つねに15%前後の分裂率を誘導することができた。しかし、褐変化が徐々に進行するため、40~60日後に約1 mm以上のコロニーに生長して、さらにカルスへの生長が約束されるコロニーの形成は低頻度であった。8E 培地⁹⁾では、プロトプラストはMS 基本培地で無菌培養した子葉から単離した。第1回分裂は培養後3, 4日で観察された。分裂率も高く、約2週間後には、0.25 mm 前後のコロニーに生長した。この時期までの褐変化はほとんどなく、コロニーの生長は順調であった。しかし、マニトール濃度を6%に下げた培地へ移しかえると、その生長は直に停滞し、カルスの形成はほとんどみられなかった。培地の種類や移しかえる方法を種々検討したが、今までのところ適当な方法を見出していない。TM-2 培地では、現在までのところでは、分裂率、コロニーの形成率とも R9 や 8E 培地よりも低いが、コロニーの生長は速く、培養10日目には、2~5%が150 μ m 以上のコロニーとなり、最大のコロニーは1 mm近いものいくつか認められた。いずれの培地でも、実験ごとに分裂率やコロニー形成率はかなりの変動を示した。トマト属の場合も、いくつかの報告が指摘するように、その変動は材料の植物体の生理的条件によって主に左右されるものと考えられる⁸⁾。R9 培地でも条件が適当であったと思われる場合には、培養後60日

目に6%マニトールの R9 培地に移し、さらに20日後にマニトールなしの MS 培地へ移して、カルスを多数形成させることができた。さらに、IAA と BA を1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mg/l で組み合わせた MS 培地で培養したところ、40日後には緑色カルスが多数えられた。しかし、シュートの再分化は見られなかった。TM-2 培地で形成されたコロニーを TM-3 の寒天培地上に移し、さらに、10日後1.0 mm~1.5 mm の小カルスを TM-4 の再分化培地へ移植した。TM-2 培地以後の培養は、SHAHIN(1985)⁶⁾の方法に従って行なったが、TM-4 培地へ移した約60ヶのカルスから30日後においても、シュートの分化は全くみられなかった。

TM-4 培地への植付け後15日目に、Zeatin 3 mg/l を含む MS 培地へカルス5個を植えかえたところ、15日目(プロトプラストの培養50日目)に1個のカルスから茎葉が分化し、ホルモンフリーの MS 培地へ移植して発根させ、植物体を復元することができた。SHAHIN(1985)⁶⁾の場合と比較してみると、本研究の場合、シュートの分化と発根まで約60日を要し、SHAHIN の40日とはかなりの隔りがある。TM-3 培地の小カルスを再分化培地へ移植する時期がやや遅れたので、これを適切に行なえば、植物体復元までの期間はさらに短縮できると思われる。SHAHIN(1985)⁶⁾はプロトプラスト単離前の暗処理と低温処理が重要であると指摘しているが、本研究では行な

Table 2. Conditions of culture of protoplast

Basal ⁽¹⁾ medium	Plant hormone				Agar or liquid	Density of Protoplast	Temp.	Light
	2, 4-D	NAA	BA	Zeatin				
MS	1.0mg/l	0.5mg/l	0.5mg/l	—	Agar	1×10 ⁵ /ml	29°C	none
R9	do.	do.	do.	—	do.	do.	do.	do.
8E	do.	do.	do.	—	do.	do.	do.	do.
TM-2	—	1.0mg/l	—	0.5mg/l	Liquid	5×10 ⁴ /ml	27°C	do.

(1): See Table 1

Table 3. Cell division, colony and callus formation in Four kinds of medium

Basal medium ⁽¹⁾	Percentage of cell division	Colony formation		Callus formation (days of culture)
		Percentage of colony larger than 150 μ m (Days after initial culture)	Size of colony	
MS	0—10	0—2 (40—60 days)	—	—
R9	10—30	5—10 (40—60 days)	0.5% (larger than 1 mm)	R9 6 M (20 days) MSOM (20 days)
8E	20—30	5—10 (15 days)	0.25 mm	R9 4 M
TM-2	10—20	2—5 (10 days)	0.2—0.5 mm	{ TM-3 : 0.5—1.5 mm (10 days) TM-4 : 2.0—5.0 mm (15 days)

(1): See Table 1

わなかった。今後検討する予定である。

引用文献

- 1) MELCHERS, G., M. D. SACRISTAN, and A. A. HOLDER(1978) : Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. Carlsberg Res. Commum. 43, 203-218.
- 2) 今西 茂(1980) : トマト (*Lycopersicon esculentum*) の葉肉プロトプラストの培養と植物体分化. 育種学雑誌 30, 別冊 2, 22-23.
- 3) MORGAN, A. and E. C. COCKING(1982) : Plant regeneration from protoplasts of *Lycopersicon esculentum* MILL. Z. Pflanzenphysiol. 106, 97-104.
- 4) KOBLITZ, H. and D. KOBLITZ(1982) : Experiments on tissue culture in the genus *Lycopersicon* MILLER : mesophyll protoplast regeneration to plants in *Lycopersicon esculentum* cv. 'Nadja'. Pant Cell Rep. 1, 143-146.
- 5) HANSON, M. R.(1982) : Cell and tissue culture of *Lycopersicon* in plant tissue culture. In : Proc. 5th Int. Cong. Plant Tissue Culture. Mt. Fuji, Japan, 193-194.
- 6) SHAHIN, E. A.(1985) : Totipotency of tomato protoplasts. Theor. Appl. Genet. 69, 235-240.
- 7) IMANISHI, S. and I. HIURA(1983) : Culture and regeneration of *Lycopersicon peruvianum* leaf protoplasts. Japan J. Breed. 33(4), 359-368.
- 8) TAL, M. and W. WATTS(1979) : Plant growth conditions and yield of viable protoplasts isolated from leaves of *Lycopersicon esculentum* and *peruvianum*. Z. Pflanzenphysiol., 92, 207-214.
- 9) ZAPATA, E. J., K. C. SINK, and E. C. COCKING (1981) : Callus formation from leaf mesophyll protoplasts of three *Lycopersicon* species, *L. esculentum*, cv. 'Walter' *L. pimpinellifolium* and *L. hirsutum*, f. *glabratum*. Plant Sci. Lett. 23, 41-46.
- 10) MURASHIGE, T. and F. SKOOG(1962) : A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15, 473-479.

Summary

Four kinds of media, MS, R9, 8E and TM-2, for the culture of protoplast were compared with respect to colony formation and regeneration from cotyledon protoplast in tomato. Seedlings of tomato cultivar "Kyoryoku Tōko" were grown under conditions of 20°C in temperature and 2,500 lux with daylength of 16 hr. in a growth chamber. Cotyledon protoplasts were isolated from young seedlings of 10 to 14 days old by the digestion with the enzyme mixture of Meiselase P, Macerozyme R10 and Driselase. MS medium was able to form only a few colonies from the cotyledon protoplast which was induced to cell division, if any, with low frequency. R9 medium was able to produce green calluses derived from cotyledon protoplast after the culture of about four months, although shoots were not

obtained. 8E medium resulted in a good cell division and colony formation in initial culture, but any successive culture was not accomplished to lead to a good formation of callus. On the other hand, TM-2 medium was able to induce the rapid growth of colony which produced mini-calluses of 0.5 to 1.5 mm in size in the culture of 10 days after transfer of colonies onto TM-3 medium. No shoot was induced, however, on TM-4 medium which was used as a medium for regeneration, while at 50 days after the initial culture of protoplast some shoots were formed on the callus which was one of the five calluses transferred onto MS medium containing 3.0 mg/1 Zeatin. Shoots were transplanted on MS medium containing no phytohormones and immediately roots were formed from them.