

葉プロトプラストの単離における表皮剥皮法に 代わる方法について

今西 茂・江頭宏昌・広野直芳・佐藤健二
(山形大学農学部園芸繁殖学研究室)
(平成2年9月1日受理)

An Alternative to 'Peeling Method' for the Isolation of
Leaf Protoplasts in *Lycopersicon* and *Solanum*.

Shigeru IMANISHI, Hiroaki EGASHIRA, Naoyoshi HIRONO and Kenji SATOH
Laboratory of Horticultural Breeding and Propagation, Faculty of Agriculture,
Yamagata University, Tsuruoka 997, Japan
(Received September 1, 1990)

Summary

1. In the enzymatic isolation of leaf protoplasts, a method of peeling off the lower epidermis of a leaf ('peeling method') or a method of slicing a leaf into thin strips ('slicing method') are commonly employed in order to facilitate the penetration of enzymes into the leaf tissue. In fact, their methods are difficult to employ in some points. Now we work out a new method of notching a leaf ('notching method') in place of 'peeling method' and 'slicing method'. This study is for the purpose of successful isolation and culture of leaf protoplasts released by employing 'notching method'.

2. *Lycopersicon esculentum* cv. "Kyoryoku Toko" and "Moneymaker", were grown on a hormone-free MS agar medium (MURASHIGE and SKOOG, 1962) under sterile conditions at 25°C and 3,000 lux. *L. chilense* "PI 128644" and *Solanum lycopersicoides* "LA 2408" were potted in compost at 25°C and 3,000 lux.

3. Yields of protoplasts from cotyledons of "Kyoryoku Toko" were compared with respect to isolation methods of leaf protoplasts, viz, 'peeling method' and 'notching method'. Although 'peeling method' was superior to 'notching method', the latter yielded practically sufficient protoplasts.

4. 'Notching method' could also present sufficient yield of protoplasts from leaves of "Moneymaker" as well as "LA 2408" and "PI 128644" after treatment.

5. Leaf protoplasts through 'notching method' from "Kyoryoku Toko", "Moneymaker" and "PI 128644" formed as good colony as protoplasts released by means of 'peeling method' and 'slicing method'.

I. 緒 論

葉を用いてプロトプラストを単離する場合、酵素処理において葉の内部へ酵素液を浸透させる必要がある。そのため、葉の裏側を剥皮し、剥皮した側を下に

して酵素液に浮かべる方法(表皮剥皮法)と葉を細断し酵素液に浸す方法(葉細断法)が用いられる^{18,4,9,17,16)}。後者の場合、酵素液に葉を浸したのち真空ポンプを用いて葉の内部の気体を抜く必要がある。気体抜きをしないとプロトプラスト収量が著しく減少する。トマト

属の葉プロトプラストを単離する場合、子葉では表皮剥皮方法を容易に適用することが出来るが⁵⁰⁾、本葉では裏側表皮の剥皮はその操作が技術的に非常に困難である。したがって、一般的に葉細断法が用いられている²⁰⁾。葉細断法の短所は気体抜きのための無菌条件下での設備と時間が入用であり、さらに、脱気の問題に関する真空ポンプ操作上の経験を必要とする。本報告では表皮剥皮法や葉細断法に代わる方法について述べる。

II 材料及び方法

1. 供試材料及びその養成

供試材料として、トマト属栽培種 *Lycopersicon esculentum* の“強力東光”および“Moneymaker”，トマト属野生種 *L. chilense* の“PI 128644”，ナス属野生種 *Solanum lycopersicoides* の“LA 2408”を用いた。野生種の種子はカリホルニア大学 C. M. Rick 教授より分譲を受けたものである。種子は無菌発芽させ、トマト属野生種“PI 128644”とナス属野生種“LA 2408”では、園芸用培土をつめた植木鉢に移植して栽培し、トマト属栽培種“強力東光”と“Moneymaker”は無菌発芽させた稚苗を植物ホルモンが添加されていない MS 基本培地⁴⁴⁾の寒天培地に移植した。無菌発芽のための種子消毒は99%エタノールに2、3秒浸したのち、10%アンチホルミン液で15分間処理して行った。消毒後、種子は9cm シャーレに濾紙2枚を敷き、4mlの滅菌水を加えて播種し、25℃、暗黒下で発芽させた。発芽後各々移植した後、幼植物は20℃、約3000luxの人工気象器中で栽培した。以上のように、トマト属栽培種“強力東光”と“Moneymaker”は無菌条件下で植物体を育成し、トマト属野生種“PI 128644”とナス属野生種“LA 2408”は非無菌条件下で育成した。プロトプラストの単離に本葉を用いる場合は、適時挿し木によって維持している植物体を用いた。子葉を用いる場合は、播種後約10日前後のものを用いた。トマト属野生種の場合には、酵素処理前に植物体全体を、25℃、暗黒下で36時間暗処理を行い、無処理区と比較した。ナス属野生種の場合も同様な酵素処理前の暗処理を行った。

2. プロトプラストの単離

本葉を用いる場合は出来るだけ若い葉を用いた。トマト属野生種“PI 128644”とナス属野生種“LA 2408”の場合は植木鉢栽培であったので、本葉は2.5%アン

チホルミン液で20分間消毒し、滅菌水で水洗した後に用いた。酵素処理に当たって、子葉、本葉とも図1に示すように、葉の裏側表皮に中肋を残して約1mm間隔に刻み目を入れ、CPW 9 M 液⁴⁾に刻み目面を下にして浮かべた。これを表皮刻み目法と呼ぶことにする。ついで、CPW 9 M 液を酵素液と入れ換え、所定の時間、25℃、暗黒下で酵素処理を行った。表1に各供試材料に対する酵素の種類、濃度、処理時間を示した。トマト属栽培種“強力東光”の子葉を用いた場合には、対照区として従来の表皮剥皮法、すなわち、葉の裏側表皮を鋭利なピンセットを用いて剥皮し、剥皮面を下にして酵素液に浮かべて処理する方法を用いた。酵素処理終了後、パスツールピペットを用いて、葉を丁寧にほぐし、150 μm メッシュで濾過し、遠沈管に濾液を移し、800 rpm で5分間遠心分離器にかけた。上澄み液を捨て、CPW 9 M 液と入れ換えて懸濁し、前と同様にして、遠心分離器にかけた。上澄み液を捨て、今度は CPW 21 S 液 (CPW 9 M 液のマニトールをショ糖 (21%) で置き換えたもの) と入れ換えて懸濁し、900 rpm、8分間遠心分離器にかけて、プロトプラストのみを浮上させた。プロトプラストは再び CPW 9 M 液に懸濁し、前と同様にして2回洗浄した。最後に、プロトプラスト懸濁液を10mlに定量し、Fuchsの血球計測盤を用いて9cmベトリ皿当りのプロトプラスト収量を推定した。

3. プロトプラストの培養

トマト属栽培種“強力東光”と“Moneymaker”及びトマト属野生種“PI 128644”のプロトプラストの

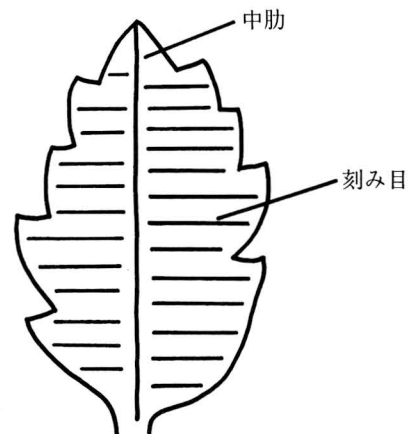


図1. 裏側表皮に刻み目を入れる例

場合には、培養実験を行った。トマト属栽培種“強力東光”の子葉プロトプラストは、Naphthaleneacetic Acid (NAA) 0.5 mg/l, Zeatin Riboside (ZR) 0.5 mg/l を含むTM-2培地¹⁶⁾，“Moneymaker”の本葉プロトプラストは LCM 培地²⁰⁾，トマト属野生種“PI 128644”の本葉プロトプラストは 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) 0.5 mg/l, NAA 0.5 mg/l, 6-Benzylaminopurine (BA) 0.5 mg/l を含む 1/2 MS 培地の液体培地を用いて、 1×10^5 /ml の密度で、直径 5 cm のファルコンデッシュを培養皿として 2 ml ずつ培養した。培養条件は 25℃，約 400 lux であった。その他の培養方法は SHAHIN (1985)¹⁶⁾ の方法に準じて行った。コロニー形成率は培養開始 10 日目に調査した。調査は培養皿ごとに細胞を培養液とともに集め、それを 5 倍に薄めたのち、その 1 ml を 5 cm 培養皿を用いて寒天培地中に固めた。顕微鏡の視野を 30 か所について 100 μ m 以上のコロニーを数え、1 ml 中のコロニー数を求め、5 cm ファルコンデッシュ当りのコロニー数を推定した。

Ⅲ 結果及び考察

葉を材料にしてプロトプラストを単離する場合、酵素液が葉の内部に浸透する必要があるため、TAKEBE ら (1968)¹⁸⁾ はタバコの葉からプロトプラストを単離する試みにおいて葉の裏側表皮を剥皮しそれを細断し酵素液中に沈めて処理する方法を用いた。タバコやバ

チュニアでは、葉プロトプラストを単離する場合、葉の裏側表皮を剥皮面を下にして酵素液に浮かべる表皮剥皮法が用いられている^{19,2,4,15)}。トマトの場合でも、栽培種、野生種とも表皮剥皮法によって葉プロトプラストが単離された報告は多数ある^{21,13,12,22,7)}。しかし、実際は本葉の裏側表皮剥皮は技術的に非常に困難である。従って、最近では、トマト属に限らず、標準的な方法として葉を細断し酵素液に沈める方法が用いられている^{17,10,16,20)}。一方、葉の裏側表皮に刻み目を入れ、酵素液に浮かべる刻み目法は表皮剥皮の困難な葉の場合でも適用することが可能である。トマト属栽培種“強力東光”の子葉を用いて、表皮剥皮法と表皮刻み目法がプロトプラストの収量に及ぼす影響を比較した結果を図 2 に示す。この結果は、表皮剥皮法によるプロトプラスト収量が表皮刻み目法よりも多収になることを示すと判断される。しかし、表皮刻み目法によっても十分なプロトプラスト収量が得られると考えられる。

葉のプロトプラストの収量は、単離前の葉の細胞壁や細胞内の物質構成の違いによって著しく影響されると考えられる。タバコでは植物体を比較的低照度で育成するとプロトプラスト収量が増加する¹⁾。オオムギやタバコでは低照度で育成した植物をプロトプラスト単離前に 2, 3 日間暗処理を施すとプロトプラスト収量が増加した^{5,11)}。SHAHIN (1985)¹⁶⁾ や TAN *et al.* (1987)²⁰⁾ はトマト属栽培種の葉プロトプラストの単離において酵素処理前に植物体に 24~36 時間の暗処理を施し

表 1. トマト属栽培種 *Lycopersicon esculentum* および野生種 *L. chilense* 並びにナス属野生種 *Solanum lycopersicoides* の葉プロトプラストの単離条件

種	品種または系統	器官	酵素	濃度 (%)	処理時間 (hr)
トマト栽培種	強力東光	子葉	メイセラーゼ P	3.00	15
			マセローチム R 10	0.30	
			ドリスラーゼ	0.15	
Money maker	本葉	セルリジン	0.60	16	
		マセラーゼ	0.05		
		メイセラーゼ P	3.00		
トマト野生種	PI 128644	本葉	メイセラーゼ P	3.00	21
			マセローチム R 10	0.30	
			ドリスラーゼ	0.30	
ナス野生種	LA 2408	本葉	セルリジン	0.60	18
			マセラーゼ	0.05	

注：酵素液は表中の酵素以外にマンニトール 9%，CPW 貯蔵液 10 ml/l を加え、PH 5.75 に調整し、濾過滅菌した。

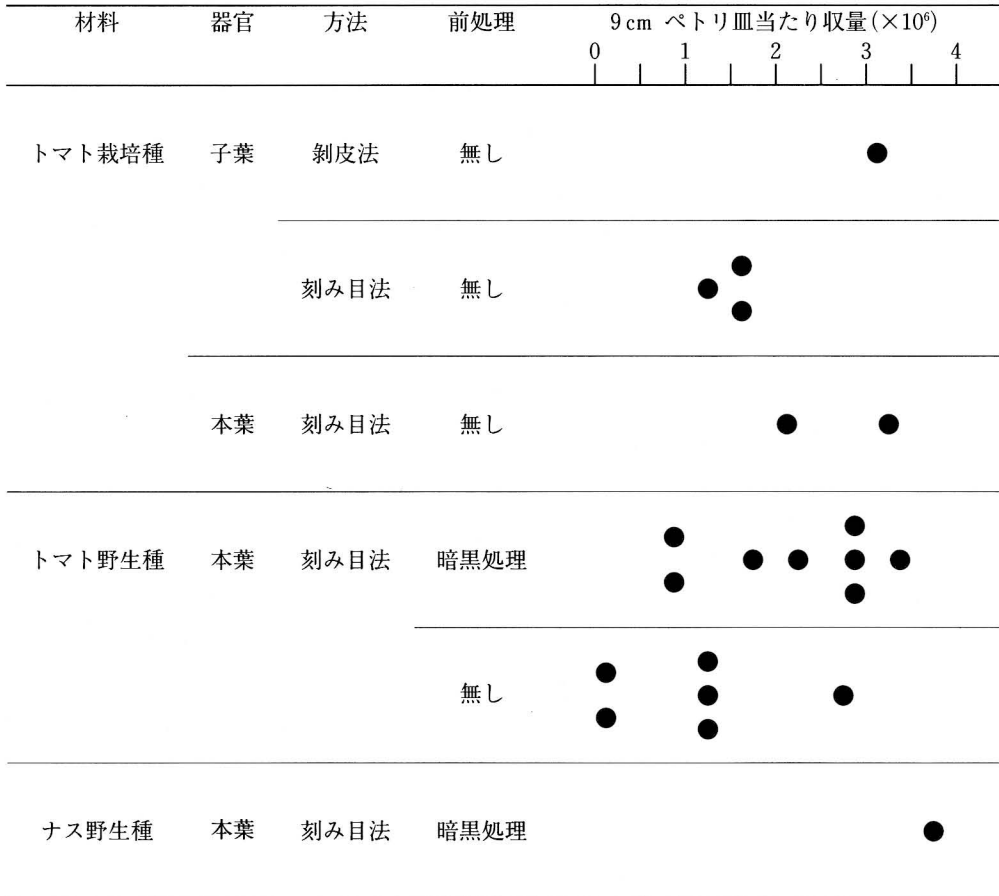


図2. トマト属栽培種および野生種ならびにナス属野生種の葉プロトプラスト単離における表皮剥皮法と刻み目法との比較

た。しかし、暗処理の効果については実験結果は示していない。著者らは、トマト属野生種の本葉プロトプラストの単離において表皮刻み目法で酵素処理を行うと葉の崩壊は十分認められるにもかかわらずプロトプラスト収量は低収に留まることを経験してきた。本研究において、トマト属野生種 *L. chilense* “PI 128644”の本葉を用いて、単離前の暗処理の効果を実験した場合と比較した。図2に示すように、暗処理によってプロトプラスト収量が増加した。これは暗処理によって光合成による物質生産が抑えられ呼吸基質が消費され、酵素処理の際、原形質分離が起り易くなって、単離できるプロトプラスト数が増加したこと、あるいは、細胞の比重の軽減によって、プロトプラストがCPW 21 S 液で浮上可能になった結果であること等が考え

られる。トマト属栽培種 “Money maker”，ナス属野生種 “LA 2408” の本葉を用いた場合のプロトプラスト収量を図2に示す。前者では9 cm シャーレ当たり $2 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$ 個，後者では同じく9 cm シャーレ当たり約 4×10^6 個のプロトプラスト収量が得られた。表皮剥皮法の適用が実際上不可能であったトマト属栽培種及びナス属野生種などの本葉葉プロトプラストの単離において、操作が技術的に容易な表皮刻み目法の利用が可能になり、葉プロトプラストを利用した実験が今まで以上に進展するものと期待される。

トマト属栽培種の子葉及び本葉プロトプラスト，トマト属野生種本葉プロトプラストの培養結果は，プロトプラストの単離方法及び培養方法の条件が異なるため比較することは出来ないが，三者とも培養開始4，

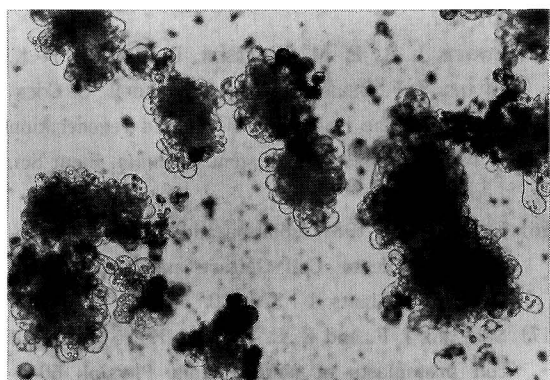


図3. トマト属栽培種“強力東光”の子葉由来葉プロトプラストからのコロニー形成

5日から細胞分裂を始め、トマト属栽培種子葉の場合には10日目には0.3~0.6mmのコロニーに成長し(図3)、栽培種本葉の場合には0.2~0.4mmに成長し、野生種本葉の場合には10日目までの成長は遅れたが、その後同一培地で良好な成長を続け、多数のカルスが得られた。培養したプロトプラスト数に対するコロニー形成率は3~6%であった。トマト属栽培種子葉、本葉、トマト属野生種本葉について、表皮剥皮法や葉細断法によって得られた葉プロトプラストの培養について多数の報告がなされている^{21,13,22,12,7,16,8,3,20}。これらの結果と比較し、本研究において表皮刻み目法で得られたプロトプラストの培養結果は遜色のないものであった。以上のように、表皮刻み目法は葉プロトプラスト培養のためプロトプラストの単離において酵素処理に際し、葉に施す処理法として有用な方法であると考えられる。

IV 摘 要

1. トマト属栽培種、野生種とも、葉プロトプラストの単離において酵素処理の際、葉の裏側表皮の剥皮は実際には技術的に困難であり、また、葉を細断する場合は、酵素液を葉組織へ浸透させることが難しい。本研究は表皮剥皮法や葉細断法に代わる表皮刻み目法を開発し、葉プロトプラストの単離及び培養について検討した結果である。

2. 供試材料として、トマト属栽培種“強力東光”と“Money maker”, トマト属野生種 *L. chilense* “PI 128644”及びナス属野生種 *S. lycopersicoides* “LA 2408”を用いた。栽培は、トマト属栽培種の場合は、

植物ホルモンを含まないMS寒天培地を用い、25℃、約3000luxの条件下で無菌的に育成した。トマト属野生種、ナス属野生種の場合は、植木鉢で栽培し、25℃、約3000luxの条件下で生育させた。

3. トマト属栽培種“強力東光”の子葉を用い、表皮剥皮法と表皮刻み目法によって葉プロトプラスト収量の比較を行った。葉プロトプラストの収量は表皮剥皮法が表皮刻み目法より優っていたが、表皮刻み目法によっても十分なプロトプラスト収量が得られた。

4. トマト属野生種“PI 128644”の本葉では、プロトプラスト単離前の暗処理を組み合わせることにより、表皮刻み目法によって十分な葉プロトプラスト収量が得られた。トマト属栽培種“Money maker”, ナス属野生種“LA 2408”においても、刻み目法によって十分なプロトプラスト収量が得られた。

5. トマト属栽培種“強力東光”と“Money maker”, 野生種“PI 128644”の葉プロトプラストを培養した結果、表皮剥皮法や葉細断法によって得られたプロトプラストと同様に良好なコロニー形成が認められた。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、山形大学農学部園芸繁殖学研究室樋浦巖教授、鈴木洋助教授、白岩恵美子技官には種々ご協力を頂きました。記して深甚なる謝意を表します。

V 引 用 文 献

- 1) BINDING, H. 1975. Reproducibly high plating efficiencies of isolated mesophyll protoplasts from shoot cultures of tobacco. *Physiol. Plat.* 35 : 225-227.
- 2) CARLSON, P. S., H. H. SMITH, and R. D. DEARING. 1972. Parasexual interspecific plant hybridization. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 69 : 2292-2294.
- 3) CHEN, L., S. IMANISHI, and I. HIURA. 1987. Culture of cotyledon protoplast of *Lycopersicon esculentum* — Effect of pre-treatment before the isolation of protoplasts on the yield and cell division of protoplasts—. *J. Yamagata Agr. For. Soc.* 44 : 65-69.
- 4) FREARSON, E. M., J. B. POWER, and E. C. COCKING. 1973. The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. *Developmental Biology.* 33 : 130-137.

- 5) HUGES, B. G., F. G. WHITE, and M. A. SMITH. 1978. Effect of plant growth isolation and purification condition on barley protoplast yield. *Biochem. Physiol. Pflanz.* 172 : 62-65.
- 6) 今西 茂・樋浦 巖. 1982. トマトの葉プロトプラストの単離と培養. 山形大学紀要 (農学). 9 (1) : 111-119.
- 7) IMANISHI, S. and I. HIURA. 1983. Culture and regeneration of *Lycopersicon peruvianum* leaf protoplasts. *Japan. J. Breed.* 33 : 359-368.
- 8) IMANISHI, S. and Y. SUTO. 1987. Plant regeneration from cotyledon protoplasts of *Lycopersicon pimpinellifolium*. *Japan. J. Breed.* 37 : 199-202.
- 9) KARTHA, K. K., M. R. MICHAYLUK, K. N. KAO, O. L. CAMBORG and F. CONSTABEL. 1974. Callus formation and plant regeneration from mesophyll protoplasts of rape plants (*Brassica napus* L. cv. Zephyr). *Plant Sci. Lett.* 3 : 265-271.
- 10) KOHLENBACH, H. W., G. WENZEL, and F. HOFFMANN. 1982. Regeneration of *Brassica napus* plantlets in cultures from isolated protoplasts of haploid stem embryos as compared with leaf protoplasts. *Z. Pflanzenphysiol.* 105 : 131-142.
- 11) LANDGREN, C. R. and H. T. BONNETT. 1979. The culture of albino tobacco protoplasts treated with polyethylene glycol to induce chloroplast incorporation. *Plant Sci. Lett.* 16 : 15-21.
- 12) MORGAN, A. and E. C. COCKING. 1982. Plant regeneration from protoplasts of *Lycopersicon esculentum* MILL. *Z. Pflanzenphysiol.* 106 : 97-104.
- 13) MUHLBACH, H. 1980. Different regeneration potentials of mesophyll protoplasts from cultivated and a wild species of tomato. *Planta.* 148 : 89-96.
- 14) MURASHIGE, T. and F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 : 473-497.
- 15) POWER, J. B., E. M. FREARSON, D. GEORGE, P. K. EVANS, S. F. BERRY, C. HAYWARD and E. C. COCKING. 1976. The isolation, culture and regeneration of leaf protoplasts in the genus *Petunia*. *Plant Sci. Lett.* 7 : 51-55.
- 16) SHAHIN, E. A. 1984. Isolation and culture of protoplasts : Tomato. *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants.* 1 : 370-380.
- 17) SHEPARD, J. F. and R. E. TOTTEN. 1977. Mesophyll cell protoplasts of potato. *Plant Physiol.* 60 : 313-316.
- 18) TAKEBE, I., Y. OTSUKI and S. AOKI. 1968. Isolation of tobacco mesophyll cells in intact and active state. *Plant & Cell Physiol.* 9 : 115-124.
- 19) TAKEBE, I., G. LABIB and G. MELCHERS. 1971. Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. *Naturwissenschaften.* 58 : 318-320.
- 20) TAN, M. M. C., E. M. RIETVELD, GIJSBERT, A. M. van MARREWIK, and A. J. KOOL. 1987. Regeneration of leaf mesophyll protoplasts of tomato cultivars (*L. esculentum*) : factors important for efficient protoplast culture and plant regeneration. *Plant Cell Reports.* 6 : 172-175.
- 21) ZAPATA, F. J., P. K. EVANS, J. B. POWER, and E. C. COCKING. 1977. The effect of temperature on the division of leaf protoplasts of *Lycopersicon esculentum* and *Lycopersicon peruvianum*. *Plant Sci. Lett.* 8 : 119-124.
- 22) ZAPATA, F. J., K. C. SINK, and E. C. COCKING. 1981. Callus formation from leaf mesophyll protoplasts of three *Lycopersicon* species : *L. esculentum*, c. v. Walter, *L. pimpinellifolium* and *L. hirsutum*, f. *glabratum*. *Plant Sci. Lett.* 23 : 41-46.