

Solanum toxicariumの葉肉プロトプラストからの植 物体再生

佐土原, 武史
九州大学農学部園芸学講座

大久保, 敬
九州大学農学部園芸学講座

藤枝, 國光
九州大学農学部園芸学講座

<https://doi.org/10.15017/23503>

出版情報：九州大学農学部學藝雑誌. 48 (1/2), pp.13-19, 1993-12. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：



Solanum toxicarium の葉肉プロトプラストからの植物体再生

佐土原 武 史*・大 久 保 敬・藤 枝 國 光**

九州大学農学部園芸学講座

(1993 年 4 月 6 日受理)

Plant Regeneration from Mesophyll Protoplasts of *Solanum toxicarium*

Takeshi SADOHARA, Hiroshi OKUBO and
Kunimitsu FUJIEDA

Laboratory of Horticultural Science, Faculty of Agriculture,
Kyushu University 46-01, Fukuoka 812

緒 言

ナスはわが国の主要野菜の一つであり、土壌伝染病害の対策として、病害抵抗性台木を用いた接ぎ木栽培が一般的に行われている。しかし、病害の種類が多く、しかも青枯病菌のようにレース分化の著しいものがあることから、単独ですべての病害抵抗性を備え、かつ収量性も確実な台木植物はこれまでのところ得られていない。

ナス近縁野生種の *Solanum toxicarium* はナス土壌伝染性病害である青枯病 (Ali *et al.*, 1990), 半枯病 (望月・山川, 1978), 根瘤線虫病 (Ali *et al.*, 1992) のすべてに対し強度抵抗性を有しているが、ナスの台木として利用した場合、収量が落ちるという点で問題がある (Ali, 1991)。 *Solanum toxicarium* の病害抵抗性を、現在台木として用いられているナスあるいは近縁野生種に導入することができれば理想的な台木植物となりうる。しかし、ナスあるいは近縁野生種と *S. toxicarium* の交雑親和性は低く (西尾ら, 1984), 交配による雑種植物の獲得に成功した例はない。

交雑親和性の低い、あるいはない組み合わせの植物間の雑種を作り出す技術として、細胞融合が注目されている。トマトとジャガイモの体細胞雑種が細胞融合によって作出されて以来 (Melchers *et al.*, 1978),

種間や属間といった遠縁間の組み合わせでの体細胞雑種が数多く作出されている。

細胞融合を行うためには、再現性のあるプロトプラスト培養系が不可欠であるが、*S. toxicarium* についてはこれまでのところ安定的にプロトプラストから植物体を再生できる培養系は確立されていない。そこで本研究では、*S. toxicarium* のプロトプラスト培養系を確立するために、プロトプラストの単離から植物体再生までの各段階における培養条件を検討した。

材料および方法

Solanum toxicarium の種子を、20%次亜塩素酸ナトリウム溶液 (有効塩素2%) に20分間浸漬して表面を殺菌し、滅菌水で3回洗浄した後、1%のショ糖および0.25%のゲルライトを添加した1/2MS培地 (Murashige and Skoog, 1962) (pH = 5.5) に置床し、25°C, 28.4 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ 連続照明下で発芽、生育させた。播種後6週目に腋芽を含む各節を、葉を残して約1cmの長さに切り取り、発芽用培地と同じ培地に移植した。以下に示した1. ~ 6. のいずれの実験においても、移植後6週目頃、腋芽から伸長した本葉をプロトプラストを単離する材料として供した。

1. プロトプラストの単離条件の検討

切り取った約20枚の本葉を、13%のマンニトール液20ml (pH=5.5) 中で中肋と直角に1~2mm幅に細断し、浸漬した。1時間後にマンニトール液を除去し、0.05%または0.20%のマセロザイム R10 と、0.25%または1.00%のメイセラゼとを組み合わせで添

* 現在 三井東圧肥料

**現在 三井東圧化学ライフサイエンス開発部

加した1/2MS培地(ショ糖1%, マンニトール0.5M, pH=5.5)(酵素液)を20ml加えた。酵素処理は25°C, 暗黒条件下で, 16時間静置あるいは75strokes $\cdot$ min $^{-1}$ で4時間往復振とうすることにより行った。処理した懸濁酵素液をナイロンメッシュ(50 μ m)で濾過し, プロトプラストを得た。得られたプロトプラストを, 1/2MS培地(NH $_4$ NO $_3$ のみ200mg $\cdot$ liter $^{-1}$ に修正, ショ糖1%, マンニトール0.4M, pH=5.5)で3回洗浄した後, 血球計算盤を用いてプロトプラストの密度を計測し, 培養時の密度が5.0 $\times$ 10 4 $\cdot$ ml $^{-1}$ となるように調整した。プロトプラストを0.1mg $\cdot$ liter $^{-1}$ のナフトレン酢酸(NAA)および0.1mg $\cdot$ liter $^{-1}$ のカイネチンを添加した1/2MS培地(NH $_4$ NO $_3$ のみ200mg $\cdot$ liter $^{-1}$ に修正, ショ糖1%, マンニトール0.4M, pH=5.5)(初代培地)に懸濁した後, 直径6cmのシャーレに2mlずつ滴下し, 25°C, 暗黒条件下で静置培養した。培養開始後2週目と3週目に, マンニトール濃度を0.2Mに変更した初代培地を2mlずつ添加した。培養開始後5週目に直径0.5mm以上に生育したコロニー数を調査した。

2. プロトプラストの培養密度の検討

0.05%のマセロザイムR10および0.25%のメイセラゼを添加した1/2MS培地(ショ糖1%, マンニトール0.5M, pH=5.5)を用い, 25°C, 暗黒条件下で16時間静置処理することにより, 本葉からプロトプラストを単離した。プロトプラストをさまざまな密度に調整し, 以下1.と同様の方法で培養および調査を行った。

3. 初代培地におけるホルモン組成の検討

2.と同様の方法で本葉からプロトプラストを単離し, 培養時の密度が5.0 $\times$ 10 4 $\cdot$ ml $^{-1}$ となるように調整した。プロトプラストを, 0, 0.1および1.0mg $\cdot$ liter $^{-1}$ のNAAと, 0, 0.1および1.0mg $\cdot$ liter $^{-1}$ のカイネチンとを組み合わせ添加した1/2MS培地(NH $_4$ NO $_3$ のみ200mg $\cdot$ liter $^{-1}$ に修正, ショ糖1%, マンニトール0.4M, pH=5.5)(初代培地)に懸濁した。以下1.と同様の方法で培養および調査を行った。

4. 培養温度の検討

2.と同様の方法で本葉からプロトプラストを単離した。培養開始の温度を25°Cまたは30°Cとし, 温度以外の条件は1.と同様にして培養を行った。培養開始後3週目に, それぞれの温度で培養したものを二つに分け, 新たに25°Cおよび30°C区を設けて培養を続けた。培養開始後5週目に直径0.5mm以上に生育したコロニー数を調査した後, 0.1mg $\cdot$ liter $^{-1}$ の2, 4-ジ

クロロフェノキシ酢酸(2, 4-D), 0.1mg $\cdot$ liter $^{-1}$ のNAAおよび1.0mg $\cdot$ liter $^{-1}$ のカイネチンを添加した1/2MS培地(ショ糖1%, マンニトール0.2M, pH=5.5)(コロニー育成用培地)に移植し, 25°C, 14.2 μ E $\cdot$ m $^{-2}$ $\cdot$ sec $^{-1}$ 連続照明下で培養し, コロニーの生育を促した。移植後5週目にコロニーの生存率を調査した。

5. 再分化用培地におけるホルモン組成の検討

形成されたコロニーをコロニー育成用培地に移植し, 4.と同様の条件で5週間培養してプロトプラスト由来カルスを得た。そのカルスを, 0.1mg $\cdot$ liter $^{-1}$ のインドール酢酸(IAA)と, N 6 -ベンジルアデニン(BA), カイネチンおよびゼアチンをそれぞれ1, 3および5mg $\cdot$ liter $^{-1}$ の濃度で組み合わせて添加したMS培地(ショ糖3%, 寒天0.7%, pH=5.5)(再分化用培地)に置床し, 25°C, 14.2 μ E $\cdot$ m $^{-2}$ $\cdot$ sec $^{-1}$ 連続照明下で培養して茎葉の再分化を図った。置床後4週目にシュート形成率を調査した。

6. 発根用培地の検討

プロトプラスト由来カルスを, 0.1mg $\cdot$ liter $^{-1}$ のIAAおよび5mg $\cdot$ liter $^{-1}$ のゼアチンを添加したMS培地(ショ糖3%, 寒天0.7%, pH=5.5)に置床し, 5.と同様の条件で培養した。置床後4週目に形成されたシュートを, 葉を残して茎頂から約2cmの長さに切り取り外植体とした。5, 10および20g $\cdot$ liter $^{-1}$ のショ糖を添加した, 1, 1/2および1/3の塩類濃度のMS培地(寒天0.7%, pH=5.5)(発根用培地)に切り取ったシュートを移植し, 25°C, 14.2 μ E $\cdot$ m $^{-2}$ $\cdot$ sec $^{-1}$ 連続照明下で培養して発根を促した。移植後4週目に発根率を調査した。

結果および考察

1. プロトプラストの単離条件の検討

プロトプラストの単離条件を検討した結果を第1表に示した。1.00%のメイセラゼおよび0.20%のマセロザイムを含む酵素液で単離したプロトプラストは, 培養しても細胞分裂を起こさず, 高濃度の酵素処理は, プロトプラストの活性を著しく低下させるものと考えられた。酵素濃度のいかにかわらず, 4時間往復振とう処理すると, 壊れた細胞が多くなり, プロトプラストの収量が低くなった。これは振とう回数を75strokes $\cdot$ min $^{-1}$ から40strokes $\cdot$ min $^{-1}$ に減らした場合も同様であり, 培養に十分量のプロトプラストを得るためには, 16時間静置処理の方が適当であると考えられた。0.25%のメイセラゼおよび0.05%のマ

Table 1. Effects of enzyme treatment on protoplast yield and colony formation in protoplast culture of *S. toxicarium*.

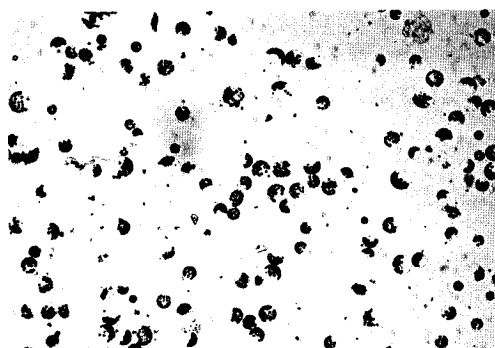
Meiserase (%)	Maserozyme (%)	Treatment	Yield ($\times 10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$)	Cell division ^z	No. of colonies
0.25	0.05	No shaking	4.5	+ (2) ^y	21
0.25	0.05	Shaking	0.1	—	—
1.00	0.20	No shaking	6.3	—	—
1.00	0.20	Shaking	1.2	—	—

Medium : 1/2 MS with 1% sucrose, 0.4 M mannitol, $0.1\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ NAA and $0.1\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ kinetin.

^z Volume of protoplast suspension = 6.0ml, protoplast density = $5 \times 10^4 \cdot \text{ml}^{-1}$.

^y Days to first cell division.

セロザイムを含む酵素液で16時間静置処理することにより、活性の高いプロトプラストを多数得ることができた (第1図)。

**Fig. 1.** Mesophyll protoplasts of *S. toxicarium*.

2. プロトプラストの培養密度の検討

培養開始後5週目に形成されたコロニー数を第2図に示した。 $1.0 \times 10^4 \cdot \text{ml}^{-1}$ 以下の低密度では、培養しても細胞分裂に至らなかった。逆に、 $5.0 \times 10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$ の高密度では、細胞分裂は認められたが、プロトプラストが凝集し、1~2回の分裂を行った後に生育が止まり、移植可能な大きさのコロニーは形成されなかった。 $5.0 \times 10^4 \cdot \text{ml}^{-1}$ および $1.0 \times 10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$ の密度で培養を行うと、直径0.5mm以上の移植可能な大きさのコロニーが形成された (第3図)。最も多くのコロニーを形成した $5.0 \times 10^4 \cdot \text{ml}^{-1}$ の密度が培養に最適であると考えられた。

3. 初代培地におけるホルモン組成の検討

第2表に示したように、培養開始後5週目にコロニーが形成されたのは、NAA $0.1\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ 、カイネチン $0.1\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ の区のみであった。NAA およびカ

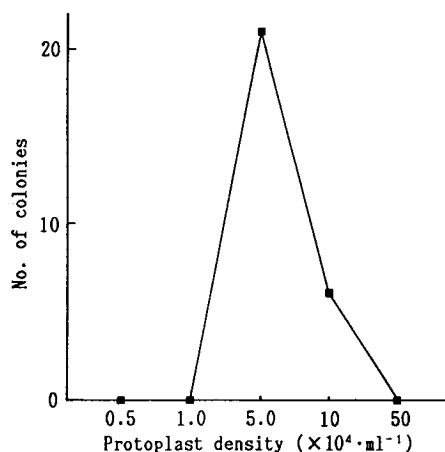
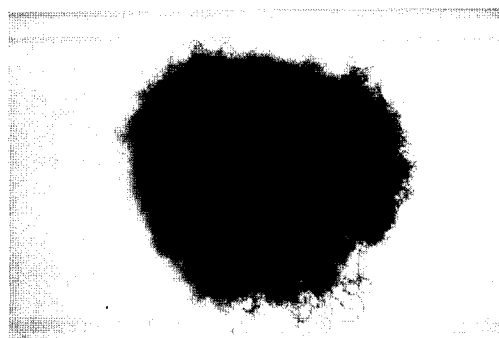
**Fig. 2.** Effect of protoplast density on colony formation in protoplast culture of *S. toxicarium*.**Fig. 3.** Cell colony of *S. toxicarium* (5 weeks after culture).

Table 2. Effects of NAA and kinetin concentration on colony formation in protoplast culture of *S. toxicarium*.

Conc. (mg · liter ⁻¹)		Volume of protoplast suspension ^z (ml)	Cell division	No. of colonies
NAA	Kinetin			
0	0	6.0	—	—
0	0.1	6.0	—	—
0	1.0	6.0	—	—
0.1	0	6.0	—	—
0.1	0.1	6.0	+ (2) ^y	15
0.1	1.0	6.0	+ (3)	0
1.0	0	6.0	—	—
1.0	0.1	6.0	+ (2)	0
1.0	1.0	6.0	+ (2)	0

^z Protoplast density = $5 \times 10^4 \cdot \text{ml}^{-1}$.^y Days to first cell division.**Table 3.** Effect of temperature on colony formation in protoplast culture of *S. toxicarium*.

Temperature(°C)		Volume of protoplast suspension ^z (ml)	No. of colonies	Percent colonies survived ^y
0-3 weeks	3-5 weeks			
25	25	6.0	4	100
25	30	6.0	7	100
30	25	6.0	58	100
30	30	6.0	85	53

Medium : 1/2 MS with 1% sucrose, 0.4 M mannitol, 0.1mg · liter⁻¹NAA and 0.1mg · liter⁻¹ kinetin.^z Protoplast density = $5 \times 10^4 \cdot \text{ml}^{-1}$.^y 5 weeks after transfer.

イネチンのいずれか、またはその両方とも含まない区で培養したプロトプラストは細胞分裂に至らなかった。その他の区では、異常に肥大した細胞が多く認められ、そのような細胞は分裂しても途中で生育を停止し、移植可能な大きさのコロニーは形成されなかった。細胞分裂およびコロニーの形成には、初代培地中の NAA およびカイネチンの濃度は、いずれも $0.1\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ が適当であると考えられた。

4. 培養温度の検討

培養開始後 5 週目に形成されたコロニー数、およびコロニー育成用培地に移植後 5 週目のコロニーの生存率を第 3 表に示した。培養開始から 3 週目までを 30°C で培養した区では、同期間 25°C で培養した区と比べて非常に多くのコロニーが形成された。しかし、培

養開始から 5 週目までを 30°C で培養し続けた区では、コロニー育成用培地に移植後、褐変、枯死するコロニーが多く認められ、生存率が他の区に比べて大きく劣った。このことから、初期培養時における温度は、コロニー形成だけでなく、その後の生育にも影響を及ぼすものと考えられた。培養開始から 3 週目までを 30°C で培養し、その後の 2 週間を 25°C で培養することにより、健全なコロニーを多数得ることができた。

5. 再分化用培地におけるホルモン組成の検討

プロトプラスト由来カルスからのシュート形成に及ぼすホルモン組成の影響を第 4 表に示した。再分化用培地に置床後 4 週目には、いくつかの処理区においてシュートが形成された (第 4 図)。シュートの形成率は、ゼアチン $5\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ の区で最大となった。カ

Table 4. Effects of cytokinins on shoot formation of protoplast-derived calli of *S. toxicarium*.

Cytokinin	Concentration (mg · liter ⁻¹)	No. of calli	
		cultured	forming shoots
BA	1.0	63	0 (0) ^z
	3.0	63	0 (0)
	5.0	63	0 (0)
Kinetin	1.0	63	0 (0)
	3.0	63	8 (12.7)
	5.0	63	3 (4.8)
Zeatin	1.0	63	0 (0)
	3.0	63	17 (27.0)
	5.0	63	22 (34.9)

^z Percent calli forming shoots.**Fig. 4.** Shoot regeneration from protoplast-derived callus of *S. toxicarium* (4 weeks after transfer).

イネチンを含む区ではゼアチンを含む区よりもシュート形成率がやや劣り、BAを含む区ではシュートの形成は認められなかった。栽培ナスやナス近縁野生種の数種において、プロトプラスト由来カルスからの茎葉の再分化にはゼアチンが有効であるという報告は多い (Nishio ら, 1987; Asao ら, 1989)。本実験で用いた *S. toxicarium* の場合も、天然サイトカイニンであるゼアチンが、合成サイトカイニンであるカイネチンや BA と比べてより有効に作用したものと考えられた。

6. 発根用培地の検討

発根用培地における MS 培地の塩類濃度およびショ糖の濃度がシュートの発根に及ぼす影響を第 5 表に示した。塩類およびショ糖ともに、濃度が高くなるにつ

Table 5. Effects of MS salts strength and sucrose concentration on rooting of shoots obtained from protoplast-derived calli of *S. toxicarium*.

MS salts strength	Conc. of sucrose (g · liter ⁻¹)	No. of shoots	
		cultured	forming roots
1	5	15	12 (80.0) ^z
	10	15	9 (60.0)
	20	15	7 (46.7)
1/2	5	15	12 (80.0)
	10	15	10 (66.7)
	20	15	10 (66.7)
1/3	5	15	14 (93.3)
	10	15	9 (60.0)
	20	15	10 (66.7)

^z Percent shoots forming roots.

れて発根率が悪くなる傾向が認められた。ショ糖 $5\text{g} \cdot \text{liter}^{-1}$ 、塩類濃度 $1/3$ の MS 培地に移植することにより、ほとんどのシュートが発根した (第5図)。

以上のように、プロトプラストの単離、細胞分裂、コロニー形成、プロトプラスト由来カルスからのシュート形成およびシュートからの発根の各過程における適当な培養条件が明らかとなり、*S. toxicarium* のプロトプラスト培養系を確立することができた。

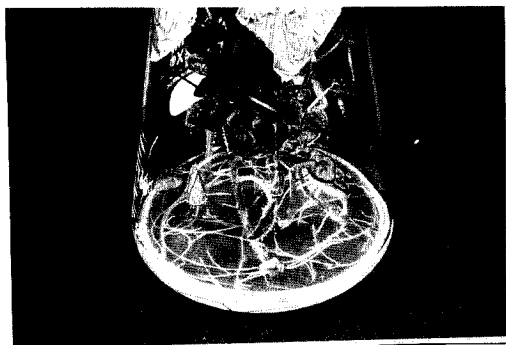


Fig. 5. Regenerated plantlets of *S. toxicarium*.

要 約

Solanum toxicarium の葉肉プロトプラストの培養条件について検討した。葉肉プロトプラストの材料として無菌的に育成した実生苗を用いた。苗の本葉を裁断し、 0.25% のメイセラゼおよび 0.05% のマセロザイムを含む酵素液を用い、 25°C 、16 時間静置処理することにより、活性の高いプロトプラストが多数得られた。初代培地として $0.1\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ NAA および $0.1\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ カイネチンを含む $1/2\text{MS}$ 培地を用い、 $5.0 \times 10^4 \cdot \text{ml}^{-1}$ の密度で培養することにより、多くのコロニーが得られた。培養開始から3週目までを 30°C 、その後2週間を 25°C で培養することにより、健全なコロニーが多数得られた。プロトプラスト由来カルスからの茎葉の再分化にはゼアチンが効果的であり、ゼアチンを $5\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ とした MS 培地で移植後4

週目に 34.9% のシュート形成率が得られた。ショ糖 $5\text{g} \cdot \text{liter}^{-1}$ 、塩類濃度 $1/3$ の MS 培地に移植することにより、ほとんどのシュートが発根した。以上の実験により、*S. toxicarium* の葉肉プロトプラストからの植物体を再生させる培養系を確立することができた。

文 献

- Ali, M. 1991 Breeding eggplant rootstock for multiple disease resistance. Ph D Thesis, Kyushu Univ.
- Ali, M., N. Matsuzoe, H. Okubo and K. Fujieda 1992 Resistance of non-tuberous *Solanum* to root-knot nematode. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **60**: 921-926
- Ali, M., M. A. Quadir, H. Okubo and K. Fujieda 1990 Resistance of eggplant, its wild relatives and their hybrids to different strains of *Pseudomonas solanacearum*. *Scientia Hort.*, **45**: 1-9
- Asao, H., M. Tanigawa, S. Arai and H. Kobatake 1989 Plant regeneration from mesophyll protoplasts of the eggplant and its wild species. *Bull. Nara. Agri. Expt. Sta.*, **20**: 73-78
- Melchers, G., M. D. Sacristan and A. A. Holder 1978 Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. *Carlsberg Res. Commun.*, **43**: 203-218
- 望月英雄・山川邦夫 1978 ナス耐病性育種に関する研究。第2報。ナス半枯病抵抗性育種素材の検索と種間交雑初期世代の半枯病抵抗性検定。園学要旨, 昭53春: 186-187
- Murashige, T. and F. Skoog 1962 A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, **15**: 473-497
- 西尾 剛・望月英雄・山川邦夫 1984 ナスおよびその近縁種の種間交雑に関する研究。野菜試報, A **12**: 57-64
- Nishio, T., T. Sato and K. Takayanagi 1987 Efficient plant regeneration from hypocotyl protoplasts in eggplant (*Solanum melongena* L. and *Solanum insanum* L.). *Japan. J. Breed.*, **37**: 389-396

Summary

Culture conditions were studied for plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Solanum toxicarium*. Axenic seedlings of *S. toxicarium* were used as material for protoplast culture. Many viable protoplasts were isolated by incubating leaf slices in an enzyme solution containing 0.25% Meicerase and 0.05% Macerozyme for 16 hours at 25°C without shaking.

Protoplast density of $5.0 \times 10^4 \cdot \text{ml}^{-1}$ in 1/2 MS media containing $0.1 \text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ NAA and $0.1 \text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ kinetin was suitable for colony formation. Most colonies were formed when protoplasts were cultured at 25°C for 2 weeks after initial culture at 30°C for 3 weeks. On the MS agar medium with $5 \text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ zeatin, 34.9% of protoplast-derived calli differentiated shoots. These shoots rooted on 1/3 MS medium with $5 \text{g} \cdot \text{liter}^{-1}$ sucrose and 0.7% agar, and developed into whole plants.