

栽培ナスおよび近縁野生種の葉肉プロトプラストからの植物体再生

浅尾浩史・谷川元一・荒井 滋・小島博文

Plant Regeneration from Mesophyll Protoplasts
of the Eggplant and Its Wild Species

Hiroschi ASAO, Motokazu TANIGAWA, Shigeru ARAI and Hirofumi KOBATAKE

Summary

Plant regeneration from mesophyll protoplasts of the eggplant and its wild species was investigated to nurse resistant materials for bacterial wilt.

1. The protoplast density of 5×10^4 /ml or 10^5 /ml in KM medium or 1/2 MS medium was suitable for the initial protoplast culture.
2. The callus derived from protoplasts efficiently regenerated shoots on the MS medium with IAA and zeatin for all species.
3. The whole plant could be obtained after three months by protoplast culture.
4. Especially, the plating efficiency and the shoots regeneration frequency of *Solanum sanitwongsei* were very high, so this species will be an effective material for cell fusion and selection.

Key words: Plant regeneration, Mesophyll protoplast, *S. sanitwongsei*, *S. torvum*, *S. integrifolium*.

緒

言

実験材料および方法

ナスは本県の主要野菜の1つであり、土壌病害対策として耐病性台木を用いた接木栽培が行われている。しかし、近年、その台木の効果もうすれ、青枯病の発生が増加しつつある。

そこで、著者らは、青枯病萎凋誘導物質¹⁾を用いた細胞選抜技術による耐病性台木の育成に取り組んでおり、今回は細胞選抜を行うためのプロトプラスト培養系の確立を試みた。栽培ナスおよび近縁野生種のプロトプラスト培養については、BHATTら²⁾、JIAら³⁾、SAXENAら⁴⁾、GLEDDIEら⁵⁾およびGURIら⁶⁾が1栽培種で、一度に複数種ではNISIOら⁷⁾および山内ら⁸⁾の報告がある。著者らは、一度に多くの栽培ナスおよび近縁野生種で葉肉プロトプラストから植物体の再分化ができ、とくに青枯病抵抗性品種素材として有望な*S. sanitwongsei*については、これまでに事例がなく、しかも効率良く再分化させることに成功したので、その結果を報告する。

供試材料は、栽培種の千両二号 (*Solanum melongena*)と、台木のサニトワングセイ (*S. sanitwongsei*)、トルバム・ビガー (*S. torvum*)、ヒラナス (*S. integrifolium*)、耐病VF (タキイ種苗)である。これらの種子を100ppmジベレリンに1日浸漬した後、80%エチルアルコールに数秒浸漬し、1%次亜塩素酸ナトリウムで30分殺菌処理を施した。さらに、滅菌水で3回洗浄した後、1/2 MS培地に播種し、25°C、16時間照明下で2~3週間育成した幼苗を供試した。

1. プロトプラスト単離条件の検討

無菌的に育成した各種の子葉をCPW塩¹⁾を含む0.5M マニトール液中で約1mm幅に刻み、酵素液に浸漬し、3時間振盪 (80往復/分) または16時間静置処理を行った。用いた酵素液は、0.3%、0.5%、1%および2%のセル

ラーゼオノズカR10と、0.06%、0.1%、0.2%および0.4%のマセロザイムR10とを組み合わせたCPW塩を含む0.5Mマニトール液 (10mM MES、pH5.8) で、単離処理は25°C、暗黒下で行った。各酵素処理区におけるプロトプラストの活性状態を検鏡し、その収量をトーマの血球計算盤で調査した。

2. 初代培地および細胞密度の検討

単離されたプロトプラストは、ナイロンメッシュ (50 μ m) でろ過した後、W5液⁹⁾で3回遠心分離 (100×g、3分間) して洗浄し、 $10^4 \sim 10^6$ 個/mlの細胞密度に調整後、培養実験に供した。初代培地は、2,4ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) 0.5mg/l、ナフトレン酢酸 (NAA) 1mg/l、カイネチン (KIN) 1mg/l、0.5Mマニトール液 (10mM MES、pH5.8) を含む1/2MS培地 (NH₄NO₃ 200mg/l)、KM (8P) 培地⁹⁾、CL培地⁹⁾の3区分とし、培養7日目毎に、オーキシンおよび浸透圧調節剤を含まない培地を等量添加した。培養は7日目までは25°C・暗黒下で行い、それ以後は25°C・500 lux条件下で行った。コロニー形成における初代培地お

よび細胞密度の検討には、培養14日目に、各試験区でのコロニー形成率 (PE : Plating efficiency) を調査した。

3. 再分化培地の検討

上記培地で約1mm程に生育したコロニーをC培地¹²⁾ (0.3%ゲルライト) に移植し、2週間後にグリーン化した小カルスを、さらにインドール酢酸 (IAA) 0.2mg/lとゼアチン (Zeatin) ・2-イソペンチルアデニン (2ip) ・6-ベンジルアミノプリン (BA) ・KINを各々1、3、5 mg/l組み合わせたMS培地に置床し、25°C・3,000lux・16時間照明下で培養して茎葉分化を図った。

結 果

1. プロトプラスト単離条件の検討

プロトプラスト単離条件を検討した結果は第1表のとおりであった。サニトワングセイ、ヒラナスおよび耐病VFでは、低濃度の酵素で16時間静置処理した方が、高

第1表 酵素処理条件のプロトプラスト収量・状態に及ぼす影響

Table 1 Effect of enzyme treatment on protoplast yield and activity.

<i>Solanum spp.</i>	Cellulase(%)	Mecerozyme(%)	Time(hr)	Method	Yield($\times 10^6$ /g leaf)	Activity
<i>S. sanitwongsei</i>	0.3	0.06	16	no shaking	3.0	◎
	0.5	0.1	16	no shaking	3.2	◎
	1.0	0.2	3	shaking	1.2	△~○
	2.0	0.4	3	shaking	2.0	△~○
<i>S. integrifolium</i>	0.3	0.06	16	no shaking	2.2	◎
	0.5	0.1	16	no shaking	2.7	◎
	1.0	0.2	3	shaking	0.9	◎
	2.0	0.4	3	shaking	1.4	○~◎
<i>S. torvum</i>	0.3	0.06	16	no shaking	2.6	△~○
	0.5	0.1	16	no shaking	4.3	△~○
	1.0	0.2	3	shaking	4.9	◎
	2.0	0.4	3	shaking	6.1	◎
<i>S. spp.</i> cv. Taibyou VF	0.3	0.06	16	no shaking	2.3	◎
	0.5	0.1	16	no shaking	2.6	○
	1.0	0.2	3	shaking	1.3	△
<i>S. melongena</i> cv. Senryou II	0.3	0.06	16	no shaking	2.5	◎
	0.5	0.1	16	no shaking	3.1	◎
	1.0	0.2	3	shaking	1.6	◎
	2.0	0.4	3	shaking	3.2	◎

濃度で3時間振盪処理するよりもプロトプラスト収量・状態ともよかった。トルバム・ピガーでは、逆に短時間振盪処理した方が良く、他の植物に比べて収量が高かった。千両二号は処理方法による差が認められず、いずれの方法でもプロトプラストの状態は良好であった。

2. 初代培地および細胞密度の検討

初代培地について調査した結果は第2表のとおりであった。サニトワングセイでは、プロトプラストが培養3日目より分裂を開始し、10日目には10細胞以上のコロニーを形成した。コロニー形成率（以下PEと略記する）はKM培地で48.7%と非常に高い値が認められたが、1/2 MS培地では27.8%、CL培地では細胞分裂もみられなかった。

ヒラナス、トルバム・ピガー、および耐病VFでは、KM培地と1/2 MS培地のいずれの培地でもコロニーが形成されたが、サニトワングセイに比べPEが劣った。CL培地では細胞分裂もみられなかった。

栽培種の千両二号では、KM培地で10.8%のPEを示したのに対し、1/2 MS培地では第一分裂で停止してコロニー形成には至らず褐変枯死した。CL培地では細胞分裂もみられなかった。

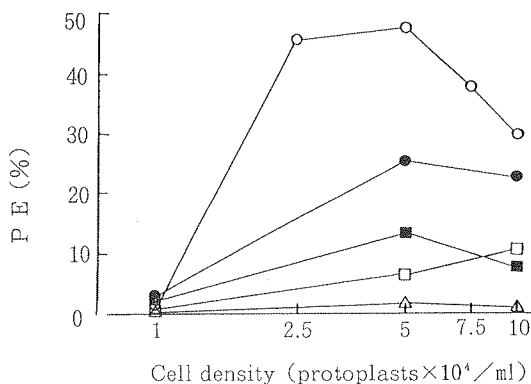
第2表 培地のPEに及ぼす影響

Table 2 Effect of three media on protoplast culture.

<i>Solanum spp.</i>	Medium	First division (days)	PE (%)
<i>S. sanitwongsei</i>	KM	3	48.7
	1/2 MS	3	27.8
	CL	—	0
<i>S. integrifolium</i>	KM	4	13.4
	1/2 MS	4	15.5
	CL	—	0
<i>S. spp.</i> cv. Taibyou VF	KM	3	25.5
	1/2 MS	3	18.0
	CL	—	0
<i>S. torvum</i>	KM	5	0.5
	1/2 MS	5	2.1
	CL	—	0
<i>S. melongena</i> cv. Senryou II	KM	5	6.4
	1/2 MS	5	0
	CL	—	0

The density of 5×10^4 /ml

細胞密度について調査した結果は第1図のとおりで、サニトワングセイ、耐病VF、ヒラナスおよびトルバム・ピガーでは 5×10^4 個/mlの細胞密度で、千両二号では 10^6 個/mlの細胞密度で、それぞれ最高のPEを示した。とくにサニトワングセイでは 2.5×10^4 個/ml~ 10^6 個/mlで30.6%~48.7%という高いPEが認められた（図版1、2、3）。



第1図 細胞密度のPEに及ぼす影響

Fig. 1 Effect of cell density on protoplast culture.

- : *S. sanitwongsei*
- : *S. spp.* cv. Taibyou VF
- : *S. melongena* cv. Senryou II
- : *S. integrifolium*
- △—△ : *S. torvum*

3. 再分化培地の検討

カルスからの茎葉分化に及ぼすサイトカイニンの種類・濃度について調査した結果は第3表のとおりであった。IAA0.2mg/l + Zeatin 1~5 mg/lを含むMS培地で全ての供試材料で茎葉分化が認められた。とくに、サニトワングセイとヒラナスは高い再分化率（48.6%と53.3%）を示した。また、KINは千両二号の再分化誘導に有効であった。

これらの茎葉分化個体は発根培地（1/2 MS）で完全な植物体に生育した（図版4、5、6）。

第3表 各種プロトプラスト由来カルの茎葉分化に及ぼすサイトカイニンの影響

Table 3 Effect of cytokinin on shoot regeneration of protoplast derived calli. (%)

<i>Solanum</i> spp.	zeatin (mg/ℓ)			2ip (mg/ℓ)			BA (mg/ℓ)			KIN (mg/ℓ)		
	1	3	5	1	3	5	1	3	5	1	3	5
<i>S. sanitwongsei</i>	28.8	46.3	48.6	1.4	8.6	5.7	7.1	0	2.9	0	13.3	3.3
<i>S. integrifolium</i>	40.0	46.7	53.3	26.6	36.7	20.0	0	3.3	6.7	0	6.7	6.7
<i>S. spp.</i> cv. Taibyou VF	23.3	6.7	6.7	0	5.0	5.0	0	0	0	0	0	3.3
<i>S. torvum</i>	3.3	10.0	6.7	0	6.7	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. melongena</i> cv. Senryou II	0	10.0	15.0	0	0	0	0	10.0	0	0	40.0	40.0

考 察 摘 要

ナスの栽培種1種と台木4種について葉肉プロトプラスト培養を試みたところ、低濃度酵素で16時間静置して得たプロトプラストを 5×10^4 個/mlの細胞密度で培養し、C培地、再分化培地、発根培地へ移植することにより、約3か月で完全な植物体を得た。しかし、コロニー形成率・茎葉再分化率は種による差が大きかった。これはNISHIOら¹⁰⁾が述べているように、同じ*Solanum*属であっても遺伝的な差異によるものであると考えられるので、さらにそれぞれの最適条件を検討する必要がある。しかし、多くのナス属植物で細胞からの再生が可能になったこと、とくにトルバム・ピガーを侵す青枯病菌群にも抵抗性を示す当场育成の台木用品種のサニトワングセイでコロニー形成率が高く、IAAとZeatinを添加したMS培地で容易に茎葉が再分化したことは、今後の細胞選抜や細胞融合などによる細胞育種に有益であると考えられる。

ナスの栽培種と台木との体細胞雑種育成については、GLEDDIEら⁴⁾や亀谷ら⁷⁾によって試みられている。著者らも現在、*in vitro*での青枯病抵抗性育種の手法として青枯病萎凋誘導物質処理による細胞選抜を試みており、培養3日目よりプロトプラスト枯死するものが増加し、カルスでも褐変が認められた。また萎凋誘導物質の最適濃度や植物間による反応の差異など解明すべき問題点はあるが、今後、本実験で得られたプロトプラスト培養系を基に、細胞選抜技術によるナスの青枯病抵抗性台木の育成研究を進める所存である。

ナスの青枯病抵抗性素材の育成を図るため、ナスおよび近縁野生種の葉肉プロトプラストからの植物体再分化について検討した。

1. いずれの供試材料でも、初代培地としてKM培地あるいは1/2MS培地を用い、 5×10^4 個/mlあるいは 10^6 個/mlの細胞密度でプロトプラスト培養を行うのが、最もコロニー形成率が高かった。
2. これらプロトプラスト由来カルスは、IAAとZeatinを含むMS培地で効率良く茎葉分化した。
3. いずれの供試材料でも、培養3か月でプロトプラストから植物体が再生された。
4. とくにサニトワングセイは、青枯病に高度の抵抗性を有し、プロトプラスト培養でのコロニー形成と再分化率が非常に高いことから、細胞融合や細胞選抜などの細胞育種に有効な材料と考えられる。

謝 辞

本研究において、御指導・御助言をいただきました奈良県農業試験場技術開発課課長小玉孝司博士に深く感謝の意を表します。

引用文献

1. BHATT, D. P. and G. FASSULIOTIS. 1981. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of eggplant. *Z. Pflanzenphysiol.* Bd. 104 : 81-89.
2. BIDNEY, D. L., J. F. SHEPARD and E. KALEIKAU. 1983. Regeneration of plants from mesophyll protoplasts of *Brassica oleracea*. *Protoplasma*. 117 : 89-92.
3. GLEDDIE, S. , W. A. KELLER and G. SETTERFIELD. 1986. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension derived protoplasts of *Solanum melongena*. *Can. J. Bot.* 64 : 335-361.
4. —————, S. , W. A. KELLER and G. SETTERFIELD. 1986. Production and characterization of somatic hybrids between *Solanum melongena* L. and *S. sisymbriifolium* Lam. *Theor. Appl. Genet.* 71 : 613-621.
5. GURI, A. and S. IZHAR. 1984. Improved efficiency of plant regeneration from protoplasts of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Plant Cell Reports*. 3 : 247-249.
6. JIA, J. and I. POTRYKUS. 1981. Mesophyll protoplasts from *Solanum melongena* var. depressum Bailey regenerate to fertile plant. *Plant Cell Reports*. 1 : 71-72.
7. 亀谷寿昭・宮沢 登・土岐精一. 1987. 白ナス (*Solanum melongena*) と赤ナス (*S. integrifolium*) の体細胞雑種の育成. 日本育種学会講演要旨 : 361.
8. KAO, K. N. and M. R. MICHAYLUK. 1975. Nutritional requirements for growth of vicia hajastana cell and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Planta*. 126 : 105-110.
9. MENCZEL, L. , I. NAGY, Z. R. KIZZ and P. MALIGA. 1981. Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana tabacum* + *Nicotiana knightiana* : correlation of resistance to *N. tabacum* plastid. *Theor. Appl. Genet.* 59 : 191-195.
10. 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. Bred.* 37 : 389-396.
11. SAXENA, P. K. , R. GILL, A. RASHID and S. C. MHESHWARI. 1981. Plantlet formation from isolated protoplasts of *Solanum melongena* L. *Protoplasma*. 106 : 355-359.
12. SHEPARD, J. F. and R. E. TOTTEN. 1977. Mesophyll cell protoplasts of potato. *Plant Physiol.* 60 : 313-316.
13. 谷川元一・浅尾浩史・岡山健夫. 1988. ナス科作物青枯病の萎凋誘導物質の定量法. 関西病虫害研究会報 : 112.
14. XU, Z. H., M. R. DAVEY and E. C. COOKING. 1981. Isolation and sustained division of *Phaseolus aureus* (mung bean) root protoplasts. *Z. Pflanzenphysiol.* 104 : 289-298.
15. 山内 進・八尋義輝. 1985. ナス類プロトプラストからの植物体再生. 植物組織培養シンポジウム講演要旨 : 23.

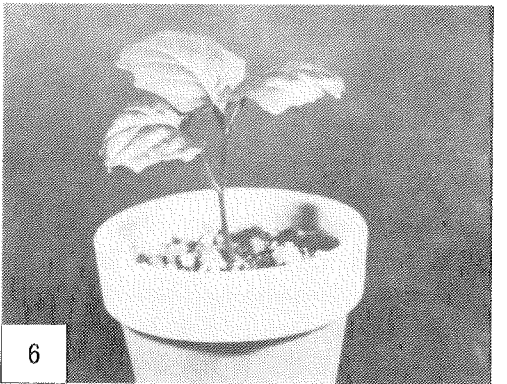
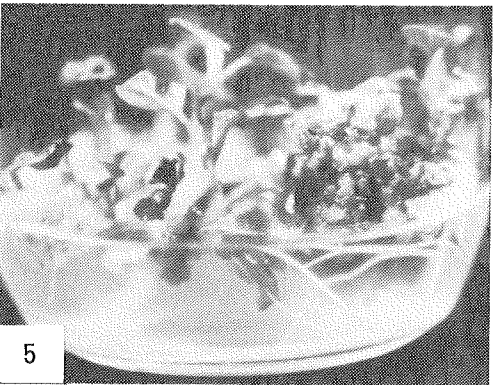
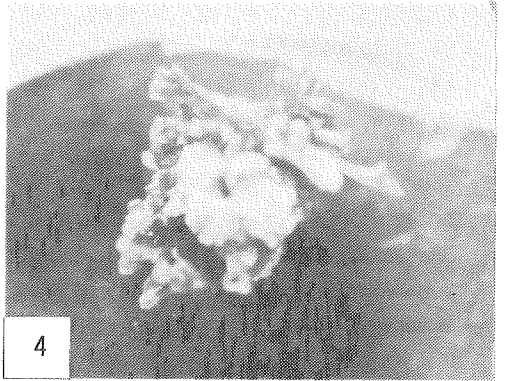
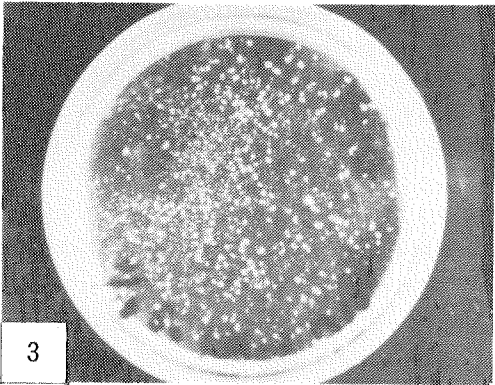
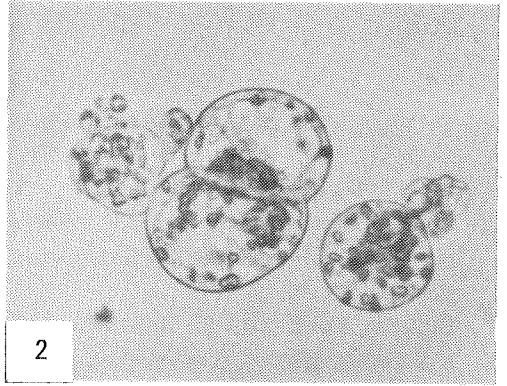
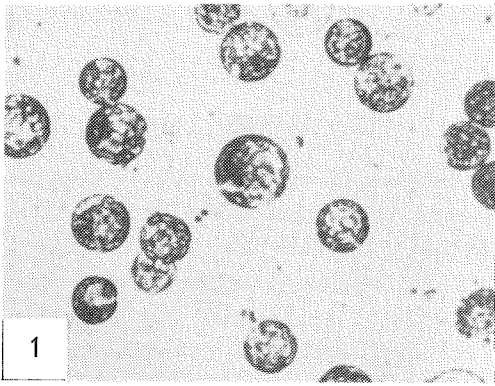


図 板
サニトワングセイの葉肉プロトプラストからの植物体再分化

1. 葉肉プロトプラスト
2. 第一分裂 (培養3日目)
3. カルス形成 (培養21日目)
4. 茎葉再分化
5. 発根
6. 植物体再分化

Plate
Plant regeneration from mesophyll protoplasts of *S. sanitwongsei*.

1. Mesophyll protoplast.
2. First division after 3 days of culture.
3. Callus formation after 21 days of culture.
4. Shoots regeneration.
5. Root formation.
6. Plant regeneration.