

## トマトの葉プロトプラストの単離と培養

今 西 茂・樋 浦 巖  
(山形大学農学部園芸繁殖学研究室)  
(昭和56年9月1日受理)

Isolation and Culture of Leaf Protoplasts in Tomatoes

Shigeru IMANISHI and Iwao HIURA

Laboratory of Horticultural Breeding and Propagation, Faculty  
of Agriculture, Yamagata University, Tsuruoka, Japan  
(Received September 1, 1981)

### 緒 論

植物細胞に大腸菌などの微生物や動物細胞と同じ遺伝子工学の技術を適用する可能性をもたらしたプロトプラストの単離と培養法の開発は(Cocking, 1960; Takebe et al., 1968), 高等植物の遺伝育種において従来の方法とは全く異なる遺伝子組換え法の体系を築くための重要な鍵といえよう。すでに, プロトプラスト融合法によっていくつかの体細胞属間雑種がえられて話題を呼び(Melchers et al., 1978; Krambiegel and Schieder, 1979; Gleba and Hoffmann, 1979), また, 多数の種間雑種も作出されている (Schieder and Vasil, 1980). その中には既存の手法では雑種獲得が不可能であった種間雑種も含まれている (Power et al., 1980). さらに, 大腸菌などの微生物においてその手法が確立した遺伝子操作技術を高等植物に適用する研究も進展しはじめている (広田ら, 1981). これらの研究はプロトプラストをいわゆる宿主として, 体細胞間で無性的な遺伝子組換えを自在に行ない, 品種改良などの技術として役立てることを最終の目標とするものである。現在までに, タバコ, ニンジン, ペチュニア, チョウセンアサガオ等を用いた研究が多く報告されているが, 重要作物への挑戦はまだ成果に乏しいのが現状である (Schieder, 1981).

トマトは園芸作物の中で世界的に重要な作物であるばかりでなく, 遺伝子地図がもっともよく研究されている作物の一つである。この点において, トマトは高等植物に対する遺伝子工学の研究にとって適した材料の一つであろう。そのためにはまず第一に, プロトプラストからの植物体復原の方法の確立が重要な課題である。トマト属においてプロトプラストからのコロニー形成と植物体復原を最初に報告した Zapata et al. (1977) の研究によると, コロニー形成には, 27~29℃, 暗黒下での培養が必要な条件であり, このことは Tal and Watts (1979) や Muhlbach (1980) によっても確認された。しかし, プロトプラスト由来カルスからの再分化は容易でなく, 葉プロトプラストからの植物体復原の報告は今のところ野生種 *L. peruvianum* のみであり (Zapata et al, 1977; Muhlbach; 1980), 栽培種 *L. esculentum* では葉条の再分化が今西 (1980) により報告されているのみである。トマト属のプロトプラストに関する研究はまだ端緒についたばかりで, まずその単離法や培養法について頻度の高い植物体復原を目標に詳細な研究がなされなければならな

第1表 葉の消毒法がプロトプラストの単離とコロニー形成におよぼす影響

品種又は系統	中性洗剤に 浸漬	水道水で 洗(10分)	70%エタ ノール浸漬	アンチ ホルミン (Tween 20)	滅菌水 6回水洗	酵素液に抗 生物質添加	プロトプ ラスト密度 /ペトリ皿	雑菌汚染	細胞分裂 コロニー 形成
L. esc.×L. per. の F <sub>2</sub>	○	○	×	3% 20分	○	×	5×10 <sup>6</sup>	+	-
Stupice	○	○	×	3% 20分	○	×	6×10 <sup>6</sup>	±	-
強力五光	○	○	×	3% 20分	○	×	6×10 <sup>6</sup>	-	-
L. esc.×L. per. の F <sub>2</sub>	○	○	×	10% 20分	○	×	1×10 <sup>6</sup>	-	-
L. peruvianum	○	○	30秒	2% 20分	○	×	0		
Chico	○	○	3分	5% 10分	○	×	0		
L. esc.×L. per. の F <sub>2</sub> (本)	○	○	5分	5% 15分	○	×	0		
L. peruvianum	×	×	×	1.5% 20分	○	○	4×10 <sup>6</sup>	±	-
Stupice	×	×	×	1% 25分	○	○	8×10 <sup>6</sup>	++	+(12.8%)
Stupice	×	×	×	1.75% 20分	○	○	5×10 <sup>6</sup>	-	+(12.1%)
L. per. (本)	×	×	×	2% 20分	○	○	7×10 <sup>6</sup>	-	-
豊 祿	×	×	×	2% 20分	○	○	10×10 <sup>6</sup>	±	+( 1.0%)
豊 祿	×	×	×	2% 20分	○	○	7×10 <sup>6</sup>	±	+( 3.2%)
Best of All	×	×	×	2.5% 20分	○	○	8×10 <sup>6</sup>	-	+( 4.5%)

(本)：本葉を使用，本葉以外は子葉を使用．抗生物質：アンピシリン，テトラサイクリン，ゲンタマイシン．

い。

本報告では、主に子葉を用いたプロトプラストの単離とコロニー形成に関して、葉の消毒法、酵素の種類や濃度、植物の栽培条件などについて2、3の知見を報告する。

### 材料および方法

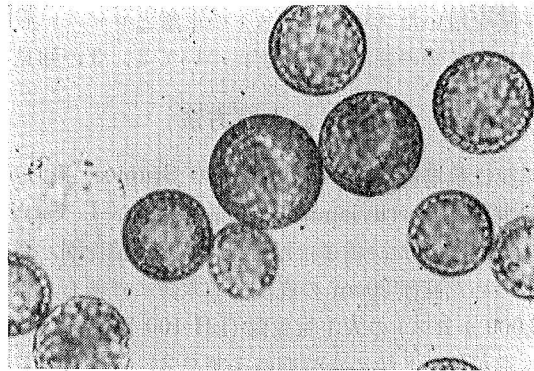
供試品種あるいは系統は栽培種 *L. esculentum* の Stupice, 強力五光, Chico, Best of all, 豊祿の五品種, 野生種 *L. peruvianum* の1系統および *L. esculentum* と *L. peruvianum* の種間雑種の  $F_2$  であった。種子は培養土(湯の浜植物園, 酒田市)と川砂を約3対1の割合で混合してつめた直径20cmの底浅の植木鉢には種し, ガラス室または25℃, 16時間日長(照度約3,000ルクス)の人工気象器(LH-100-RD, 日本医化器械製作所)で栽培した。材料の葉は本葉が伸長し始めた時期の子葉や2、3枚目の若い本葉を用いた。切り取った葉はまず第1表に示した種々の方法で消毒し, そのあと滅菌水で6回洗滌し, 裏側の表皮を剥いで, 剥いだ側を下にして滅菌した9%マニトールを含む高張液に浮べた。約1時間処理したのち, 9%マニトールを含むセルラーゼとペクチナーゼの混合液に取りかえて, 29℃の暗黒下で15~16時間酵素処理を行なった。使用した酵素混合液は, セルラーゼとペクチナーゼなどを所定の濃度にとかし, pHを5.7に調整したのちろ過滅菌して作成した。酵素処理には直径9cmのペトリ皿(Falcon Plastics Ltd.)を使用し, これに生葉重約1gの葉を浮べた。プロトプラスト収量はこの9cmペトリ皿1個当りの収量として求めた。酵素処理終了後, プロトプラストや葉くづを含む酵素液を45×gで5分間遠心分離器にかけ, つづいて沈澱物を先の高張液に再びまぜ, 同じように遠心分離器にかけた。これを2回くり返したあと, 高張液と同じ無機塩類を含む21%ショ糖液に沈澱物を入れ, 65×gで8分間遠心分離器にかけ, プロトプラストだけを液表面に浮上させた。吸い取ったプロトプラストは9%マニトールを含む培養液に再びまぜ, 1回ないし2回遠心分離器にかけ洗滌した。プロトプラスト密度が $2 \times 10^5$ /mlになるように調整した培養液1mlと約45℃に融解した1%寒天を含む培養液1mlとを直径6cmのペトリ皿(Falcon Plastics Ltd.)にとかし, 最終のプロトプラスト密度が $1 \times 10^6$ /mlになるように調整した。寒天培地中に埋め込んだプロトプラストは29℃, 暗黒下で培養した。なお, 培養基として, Gamborg et al. (1968)のB5培地を基礎培地とし, ショ糖1%, グルコース0.5%, マニトール9%, 2,4D 1.0mg/l, IAA 0.5mg/l, BA 0.5mg/lを含むものが用いられた。

### 結果および考察

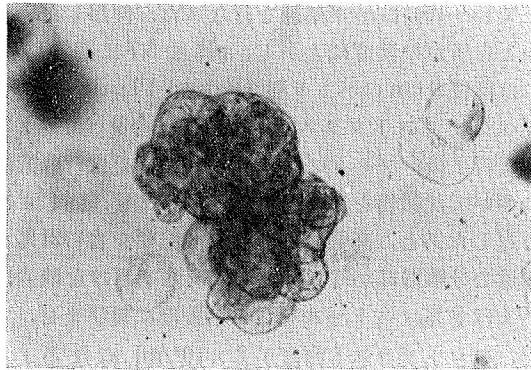
#### (1) 品種とコロニー形成

本研究では材料の葉として主に子葉を用いたが, これまでに子葉を用いた例はまだ報告されていない。トマトの若い本葉は裏側の表皮の剥皮が非常に困難である場合が多いのに対して, 子葉では剥皮は容易であった。なお, 子葉を用いる場合, 本葉の場合と比べて多量の種子を必要とする欠点があったが, 小面積で均一な栽培を行なうことが可能であり, また, 材料を採取するまでの栽培期間も短く, 整一な材料をえることのできる利点がある。トマトにおいて子葉はプロトプラスト単離の材料として有用であると考えられる。

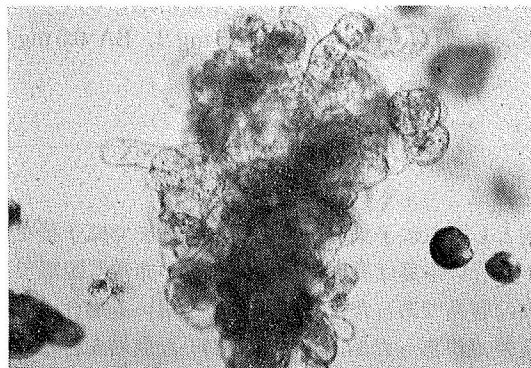
葉プロトプラストを培養してコロニーを形成させた経過を図示すると, 第1, 2, 3図



第1図 トマト (*L. esculentum*) の子葉プロトプラスト



第2図 培養後2週目におけるプロトプラスト由来の細胞塊 (*L. esculentum*)



第3図 培養後3週目におけるプロトプラスト由来のコロニー (*L. esculentum*)

のとおりである。第1図は単離された子葉プロトプラストを示す。トマトの子葉プロトプラストは本葉から単離されたプロトプラスト (Zapata et al., 1977), あるいは, タバコ (Takebe et al., 1968) やペチュニア (Hayward and Power, 1975) の葉プロトプラストともほとんど区別できない同じ外観をしている。培養されたプロトプラストは細胞分裂を始める前にまず肥大し始め, 培養後5日目頃より細胞分裂を開始した。中には培養後3日目に分裂を始めるプロトプラストも観察された。2週目には約10~20細胞からなる細胞塊がみられるようになった(第2図)。さらに1週間経過すると, それらは第3図に示すようにコロニーと呼べる程度にまで生長し, 肉眼で識別できるようになった。

第1表に示すように, 供試した栽培種5品種のうち, Stupice, 豊禄, Best of All の3品種においてコロニー形成が認められた。他の2品種強力五光, Chico については次項で説明されるように消毒法に問題があった可能性があるので, 細胞分裂やコロニー形成の能力を欠くと判定することはできないと思われる。栽培種の葉プロトプラストからのコロニー形成については, Zapata et al. (1977), Tal and Watts (1979), Muhlbach (1980) が合計4品種について報告している。本研究の結果と合わせ考えると, トマト栽培種の葉プロトプラストからのコロニー形成は比較的容易であると考えられる。本研究において注目すべき点は, *L. peruvianum* はコロニー形成や植物体再分化がトマト属の中でもっとも容易な種であると指摘されている (Muhlbach, 1980) にもかかわらず, 第1表に示されるように実験をくり返したものの細胞分裂さえ誘導できなかったことである。その原因は明らかでないが, 本研究では植物ホルモンとして Zapata et al. (1977) らの用いた NAA に代えて IAA を用いたことを指摘できる。すなわち Zapata et al. (1977), Tal and Watts (1979), Muhlbach (1980) はプロトプラスト培養培地として 2,4D 1.0 mg/l, NAA 0.5 mg/l, BA 0.5 mg/l を含む培地を用いたが, 本研究では NAA に代えて IAA 0.5 mg/l を加えた。今後培地に添加する同一系統の植物ホルモンの種類を検討する必要がある。

## (2) 葉の消毒法

Zapata et al. (1977) は "Domestos" (Lever Bros Ltd.) の7.5%液に30分間浸漬する方法を用いたが, 我国では "Domestos" の入手が困難であるから, それ以外の消毒方法を工夫しなければならない。本研究では一般にもっともよく用いられるアンチホルミン (関東化学KK) を主体とした消毒法を比較検討した。その結果は第1表に示すとおりである。中性洗剤の水溶液に浸漬し, つづいて水道の流水で10分間葉の表面に付着したほこりを落したのち, アンチホルミンで消毒する方法では, 10%アンチホルミンで20分間消毒するとプロトプラスト収量は著しく低下したが, 3%で $5 \sim 6 \times 10^6$  のプロトプラストがえられた。後者の場合, 培養後の雑菌汚染は大体許容できる範囲のものであった。中性洗剤に浸漬し, 水道水で水洗後, 70%エチルアルコールに30秒~5分間浸漬する処理を加えた場合には, プロトプラストを単離することができなかった。この場合, 酵素による葉の組織の分解は起こっていたが, 分離した細胞はことごとく破裂したのか微細な粒子により酵素液は混濁状態となっていた。したがって, 中性洗剤に浸漬, 水道水で水洗後70%エチルアルコール処理を加えることは, トマトの葉プロトプラスト単離に悪影響をおよぼすものと考えられる。つぎに, アンチホルミンのみによる消毒を行ない, 酵素液に3種類の抗生物質を添加した場合をみると, アンチホルミン1%と1.5%液では20分間処理したとき雑菌汚染が2例中2例あった。一方, 1.75%から2.5%液で20分間処理したときは雑菌汚染が

若干認められた場合が5例中1例で、他は雑菌汚染はほとんど認められなかった。これらの結果から、アンチホルミン1%液、20分間処理では消毒は不十分であり、2%液、20分間処理によって實際上支障ない程度の消毒がなされるものと推定される。ただし、材料の養成は人工気象室やガラス室を用い、灌水にさいして水が直接葉にかからないように注意する等の配慮が必要と思われる。この場合のプロトプラスト収量は $5 \sim 10 \times 10^6$ であった。コロニー形成に成功したこれまでの報告では、生葉1g当りのプロトプラスト収量は、Zapata et al. (1977) で $1.6 \times 10^6$ , Tal and Watts (1979) で $2 \sim 10 \times 10^6$ , Muhlbach (1980) で $0.5 \sim 3.0 \times 10^6$ であった。本研究におけるプロトプラスト収量も生葉重約1gの結果であったから、おおよそ標準的な収量がえられたものと考えられる。プロトプラストの単離は培養後における細胞分裂誘起とコロニー形成が目的であるから、アンチホルミン2%液、20分間処理の消毒法によって Stupice, Best of All, 豊祿のプロトプラストからコロニー形成が認められたことを考えると、この消毒法はたとえ最善でないとしても一応目的に適うものといえるであろう。

### (3) 酵素の種類と濃度

トマトの葉プロトプラストは1段階法 (Zapata et al., 1977; Muhlbach, 1980) によっても、2段階法 (Motoyoshi and Oshima, 1975; Tal and Watts, 1979) によっても、単離できることが報告されている。1段階法として Muhlbach (1980) は0.25%マセロザイム R10 と0.5%セルラーゼオノズカ R10 の混合液を使用し、Zapata et al. (1977) はメイセラゼ P 4%, マセロザイム R10 0.4%, ドリスラーゼ 0.25% を含む混合液を使用した。本研究では Zapata らの1段階法を再検討するため、Zapata らの酵素液とその酵素濃度を半分にした酵素液すなわちメイセラゼ P 2%, マセロザイム R10 0.2%, ドリスラーゼ 0.125% の混合液の比較を行なった。結果は第2表に示すように、プロトプラスト収量は前者では $7 \times 10^6$ , 後者では $6 \times 10^6$ であった。プロトプラスト単離効果は高濃度の酵素液の方が大きかったが、実際的には両者の間にほとんど差はないものと考えられる。この実験では細胞分裂を誘導できなかったのも、酵素濃度の違いが培養されたプロトプラストの細胞分裂やコロニー形成におよぼす影響を検討できなかったが、使用された酵素が単離したプロトプラストの活性に悪影響を与える場合のあることが指摘されているので (Cocking and Evans, 1973), プロトプラスト収量が許容できる範囲の差であれば、低

第2表 酵素の種類と濃度が1段階法によるプロトプラストの単離とコロニー形成におよぼす影響

酵素(%) \ 品 種	Stupice		Stupice		Best of All	
メイセラゼ P	4.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
マセロザイム R10	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
ドリスラーゼ	0.25	0.125	0.2	—	0.2	—
プロトプラスト密度 /ペトリ皿	$7 \times 10^6$	$6 \times 10^6$	$5 \times 10^6$	$7 \times 10^6$	$8 \times 10^6$	$10 \times 10^6$
コロニー形成率	0	0	12.0%	5.1%	4.6%	4.5%

濃度の酵素液を用いる方がより望ましいと考えられる。

Muhlbach (1980) はトマト葉プロトプラストの単離において、セルラーゼオノズカ R10 とマセロザイム R10 のみを用い、ドリスラーゼはプロトプラストに悪影響をおよぼすので除外したと述べている。一方、Zapata らの用いた酵素液にはドリスラーゼが混合されていた。したがって、ドリスラーゼ添加の是非を検討しておく必要があると考えられる。このため、Stupice と Best of All の2品種を用い、メイセラーゼ P 2.0%，マセロザイム R10 0.2%，ドリスラーゼ 0.2% の混合液に対して、ドリスラーゼを除外した酵素液の比較を行なった。結果は第2表に示すように、ドリスラーゼの添加によってプロトプラスト収量は相対的にかえってわづかながら低下した。しかし、酵素処理終了直後における葉組織の分解程度の観察では、ドリスラーゼを含む区の方が細胞分離の効果は明らかに大きいようにみられた。すなわち、ドリスラーゼ無添加区では分離した細胞がペトリ皿の底に沈澱している量は少なく、液面に浮んだ葉に付着したままの状態であった。他方、ドリスラーゼ添加区ではペトリ皿の底に大量の細胞が沈澱していた。また、最初に遠心分離を行なうとき、プロトプラストの懸たくした2種の酵素液を比較すると、両者の色はドリスラーゼ無添加区のあざやかな緑色に対して添加区では黄橙色を帯びた緑色であった。結局、プロトプラスト収量はドリスラーゼ無添加区の方がわづかながらまさっていたが、これはドリスラーゼ添加によってプロトプラストが一部分破壊されたためであろうと推察される。本研究では酵素処理を15~16時間行なったが、ドリスラーゼを加える場合には15~16時間の酵素処理は長すぎるのかもしれない。コロニー形成におよぼすドリスラーゼ添加の影響は、コロニー形成率が示すように、その差異はごくわづかで明らかでなかった。今後さらに検討する必要があると考えられる。

#### (4) 幼苗の栽培条件

トマトにおいて葉プロトプラストの収量とその活性は年間を通じて季節的に変動するという指摘がある (Tal and Watts, 1979)。これに関連して、プロトプラスト収量に好結果をもたらす栽培条件として、低照度 (Cassels and Barlass, 1975) や低温多湿 (Tal and Watts, 1979) の条件が挙げられている。そこで、本研究ではプロトプラスト収量におよぼす苗の栽培環境の影響を知るため、夏季ガラス室における高温条件下と対照として 25℃、16時間日長の人工気象器 (照度約3000ルクス) で生育させた2種類の苗の子葉からのプロトプラストを単離した。なお、ガラス室における栽培は1981年7月22日から8月2日まで行なわれたが、その間、晴天が続き気温が上昇し、ガラス室内では日中35~40℃の日がつづいた。品種として豊緑を用い、子葉をアンチホルミン2%液で20分間消毒したのち、所定の方法でプロトプラストを単離し培養した。酵素液としてメイセラーゼ P 2%，マセロザイム R10 0.2% を含むものを使用した。ガラス室のごく高温下で生育した子葉は生育がやゝ阻害され、対照区よりも小型で葉肉厚く、濃緑色であった。酵素処理終了時におけるプロトプラストの懸たくした混合液は、対照区であざやかな緑色であったが、高温区では黄色味を帯びた緑色であった。プロトプラスト収量は対照区  $10 \times 10^6$ 、高温区  $7 \times 10^6$  と対照区の方が多かったが、両区の間には大差はなく、両方とも第1表に示したプロトプラスト収量の中で多い方に属していた。顕微鏡観察でもプロトプラストの形態に両区の間で差はほとんどみられなかった。しかし、形のくづれたプロトプラストや葉緑体がプロトプラスト内で偏在するプロトプラストが高温区の方にやゝ多く存在するようにみられた。

コロニー形成は対照区では約6%の形成率であったが、高温区では細胞分裂も誘導できなかった。このことは、高温区から単離されたプロトプラストが対照区のものと同様に外観上それほど差異が認められなかったにもかかわらず、細胞分裂のための活性を失っていたことを示すものである。コロニー形成を目的とする葉プロトプラストの単離には、材料の栽培環境にも細心の注意を払う必要があると考えられる。

### 摘 要

1. トマトの栽培種 *L. esculentum* と野生種 *L. peruvianum* を用い、主に子葉細胞からのプロトプラストを単離し培養した。
2. 供試した栽培種5品種のうち3品種のプロトプラストからコロニーを形成できたが、*L. peruvianum* からは今回の培養条件のもとでは細胞分裂を誘導できなかった。
3. 葉の消毒法としては雑菌汚染の少ない環境条件下で栽培し、アンチホルミン2%液で20分間消毒することによって、培養後の雑菌汚染を抑え、細胞分裂、コロニー形成へ誘導しえるプロトプラストを単離することができた。
4. ドリスラーゼを除外したメイセララーゼP2%、マセロザイムR100.2%の酵素液で葉を15~16時間処理することによって十分な取量のプロトプラストをえることができた。
5. 25℃、16時間日長の人工気象器で栽培した子葉のプロトプラストはコロニー形成を誘導できたが、夏季ガラス室の高温条件下でえられた子葉のプロトプラストからは細胞分裂すら誘導できなかった。

### 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、本学部園芸繁殖学研究室白岩恵美子氏には実験材料の準備を一部担当していただいた。ここに記し感謝の意を表します。

### 引 用 文 献

- 1) Cassells, A. C. and M. Barlass (1975). Environmentally induced changes in the cell walls of tomato leaves in relation to cell and protoplast release. *Physiol. Plant.* 37 : 239-276.
- 2) Cocking, E. C. (1960). A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature* 187 : 962-963.
- 3) Cocking, E. C. and P. K. Evans (1973). The isolation of protoplasts. In : Street, H. E. (ed.), *Plant Tissue and Cell Culture*. Blackwell Scientific Publ. Oxford, 100-120.
- 4) Gamborg, O. L., R. A. Miller and K. Ojima (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50 : 151-158.
- 5) Gleba, Y. Y. and F. Hoffmann (1979). "Arabidobrassica" : Plant-genome engineering by protoplast fusion. *Naturwissenschaften* 66 : 547-554.
- 6) Hayward, C. and J. B. Power (1975). Plant production from leaf protoplasts of *Petunia parodii*. *Plant Sci. Lett.* 4 : 407-410.
- 7) 広田幸敬編 (1981), 生物室素固定の遺伝工学. 講談社サイエンティフィック (東京).
- 8) 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. 育学雑, 30, 別冊2 : 22-23.
- 9) Krumbiegel, G. and O. Schieder (1979). Selection of somatic hybrids after fusion of pro-



- toplasts from *Datura innoxia* Mill. and *Atropa belladonna* L. *Planta* 145 : 371-375.
- 10) Melchers, G., M. D. Sacristan and A. Holder (1978). Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. *Carlsberg Res. Commun.* 43 : 203-218.
  - 11) Motoyoshi, F. and H. Oshima (1975). Infection with tobacco mosaic virus of leaf mesophyll protoplasts from susceptible and resistant lines of tomato. *J. Gen. Virol.* 29 : 81-91.
  - 12) Muhlbach H. -P. (1980). Different regeneration potentials of mesophyll protoplasts from cultivated and a wild species of tomato. *Planta* 148 : 89-96.
  - 13) Power, J. B., S. F. Berry, J. V. Chapman and E. C. Cocking (1980). Somatic hybridization of sexually incompatible *Petunias*; *Petunia parodii*, *Petunia parviflora*. *Theor. Appl. genet.* 57 : 1-4.
  - 14) Schieder, O. (1981). Protoplast regeneration and somatic hybridization. *Newsletter (Intern. Assoc. Plant Tissue Culture)*, 2-6.
  - 15) Schieder, O. and I. K. Vasil (1980). Protoplast fusion and somatic hybridization. In : Vasil, I. (ed.) *Recent advances in plant cell and tissue culture*. *Internat. Rev. Cytol. Supplement* 11B, Academic Press, New York : 21-46.
  - 16) Takebe, I., Y. Otsuki and S. Aoki (1968). Isolation of tobacco mesophyll cells in intact and active state. *Pl. Cell Physiol.* 9 : 115-124.
  - 17) Tal, M. and W. Watts (1979). Plant growth conditions and yield of viable protoplasts isolated from leaves of *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum*. *Z. Pflanzenphysiol.* 92 : 207-214.
  - 18) 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.

### Summary

1) Leaf protoplasts isolated mainly from cotyledons of young seedlings belonging to commercial species *L. esculentum* and wild species *L. peruvianum* were cultured in the B5 agar medium supplemented with 9% mannitol, 1 ppm 2, 4-D, 0.5 ppm IAA and 0.5 ppm BA.

2) Three out of five commercial varieties presented cell colony formation deriving from protoplasts, but no cell division could be observed in the protoplasts of *L. peruvianum* under the condition used in the present experiment.

3) It was found that both plant growth condition with as less contamination as possible and surface sterilization of leaf with 2% antifolmin for 20 min. prepared for protoplasts controlling contamination after inoculation and resulted in cell division with cell colony formation.

4) Enzyme mixture containing 2% Meiselase P and 0.2% Macerozyme R10, omitting Driselase, could release sufficient yields of protoplast by means of incubation of leaf for 15 to 16 hr.

5) Protoplasts isolated from seedlings grown up under the condition of 25 C with 16 hr illumination could lead to cell colony formation, but seedlings from a high temperature condition in a glasshouse in summer could provide no protoplasts followed up cell division.