

ダイコン子葉プロトプラストからの不定芽形成

岸本直樹

岡山県立農業試験場
(〒709-08 岡山県赤磐郡山陽町神田沖 1174-1)

(1990年3月15日受付)

(1990年4月19日受理)

プロトプラスト培養は、細胞融合、遺伝子導入など細胞レベルでの育種手法の基礎技術として、すでに多くの植物について研究され、再分化系の確立が報告されている。なかでもアブラナ科野菜においては、西洋ナタネやキャベツなど *Brassica* 属を中心とした研究がなされており、植物体再分化の報告が多い¹⁾。しかし、ダイコン (*Raphanus sativus*) についてはプロトプラスト培養の報告²⁾が少なく、いまだにプロトプラストからの植物体再分化の報告がない。

そこで、著者はダイコンの子葉から単離したプロトプラストを培養し、カルスを形成させて再分化を試みたところ、不定芽の形成を確認したので報告する。

ダイコン (*Raphanus sativus* L.) の品種 YR-くらまの種子を、70% エタノール1分間、1% 次亜塩素酸ナトリウムに10分間浸漬滅菌し、滅菌水で3回洗浄した。これをMS培地³⁾に播種し、25°C、16時間照明で4日間培養した。展開した子葉を採取し、洗浄液(B培地⁴⁾からホルモンと Tween 80 を除く)中で細断した。2.0% セルラーゼ Y-C、0.2% ペクトリアーゼ Y-23、10mM MES、7% マンニトール、B培地塩類を含む pH 5.9 の酵素液に子葉切片を入れ、25°C、100 rpm で100分間振盪した。プロトプラストを含む酵素液を脱脂綿で濾過し、50×g で5分間遠心した後、プロトプラストの沈澱を得た。これを、洗浄液に懸濁し、同条件で遠心して酵素液を除去した。さらにもう一度洗浄し、得られたプロトプラストの沈澱をB培地(Tween 80 を除く)に再懸濁した。

プロトプラストは、 1×10^5 個/ml の密度でB培地(Tween 80 を除く)に希釈し、プロトプラスト懸濁液を3cm シャーレに2ml入れて25°C、暗所で3日間、その後25°C、16時間照明(3,000 lux)で12日間培養した。培養開始14日後にC培地⁵⁾(NAA 1mg/l, BA 1mg/l)を等量添加し、培地の半量を新たなシャーレに

移し、25°C、16時間照明で培養した。さらに14日後、0.5~1mm になったコロニーをカルス形成培地(1/2 MS 培地+2% しょ糖+0.7% 寒天+NAA 1mg/l+BA 1mg/l)に移植し、同一条件で6週間培養した。形成されたカルスは、再分化培地(1/2 MS 培地+0.5% しょ糖+0.7% 寒天+NAA 1mg/l+BA 1mg/l)に移植し、同一条件で培養した。

本実験の酵素処理条件でのプロトプラスト収量は、子葉生重1g当たり 4×10^6 個であった。プロトプラスト(Fig. 1a)は培養3日目に第1分裂(Fig. 1b)を行い、その後も約3日ごとに分裂を繰り返した(Fig. 1c)。培養14日目には32~64細胞程度のコロニーに、28日目には0.5mm程度の緑色を帯びたコロニー(Fig. 1d)に生育した。形成されたコロニーをカルス形成培地に移植したところ、1mm程度のカルスまでに生育した。しかし、9割のカルスはそこで生育を停止して褐変した。カルス形成培地移植6週間後に、まだ緑色を保っているカルス400個を再分化培地に移植したところ、移植後6週間目に不定芽の形成を1カルスで確認した(Fig. 1e)。このとき、他のカルスは1~2cmで、緑色を帯びていた。

なお、著者は本実験の3カ月前にプロトプラスト単離後21カ月を経過した長期継代カルスからの不定芽分化を確認しており(未発表)、植物体に再生させるためにその発根を試みているが、いまだ不定根の形成は確認できていない(Fig. 1f)。

プロトプラスト収量は、 1×10^6 個以上であり、適当であると考えられる。また、プロトプラストの生育は順調かつ旺盛であるので、B培地(Tween 80 を除く)およびC培地がダイコン細胞の生育に適していると考えられる。一方、カルス形成培地上でのカルスの生育が悪い点と、再分化培地での不定芽形成率が0.25%と低い点については今後の改善を必要とする。しかし、本実験によ

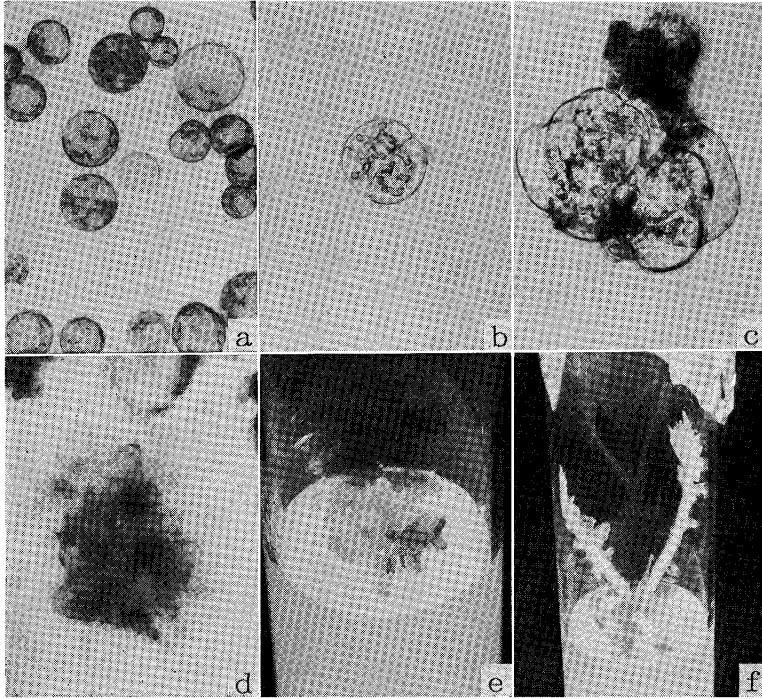


Fig. 1. Shoot regeneration from cotyledon protoplast of Japanese radish. (a) Protoplasts isolated from Japanese radish cotyledon. (b) First division after 3 days in culture. (c) Colony formation from a protoplast. (d) Further growth of colony after 4 weeks of culture on B medium lacking Tween 80 added equal volume of C medium containing 1.0 mg/l NAA. (e) Adventitious shoot formation on shoot formation medium (1/2 MS, 0.5% Sucrose, 1.0 mg/l NAA, 1.0 mg/l BA). (f) Development of leaves in a shoot obtained from a callus cultured for 21 months.

り、ダイコンにおいてもプロトプラストからの不定芽形成が可能であることを確認された。ダイコンを主体とした細胞融合、遺伝子導入などの細胞レベルの操作の可能性を示すことができたと考えられる。

本研究の経費の一部は、農林水産省地域バイオテクノロジー研究開発促進事業予算によった。

文 献

- 1) 鳥山欽哉, 亀谷寿昭, 1984. 農業および園芸, **59**: 733-740.
- 2) Jourdan, P. S., E. D. Earle, 1989. J. Am. Soc. Hort. Sci., **114**: 343-449.
- 3) Murashige, T., F. Skoog, 1962. Physiol. Plant., **15**: 473-497.
- 4) Pelletier, G., C. Primard, F. Vedel, P. Chetrit, R. Remy, P. Rousselle, M. Renard, 1983. Mol. Gen. Genet., **191**: 244-250.

Summary

Shoot Regeneration from Cotyledon Protoplast of Japanese Radish (*Raphanus sativus* L.)

Naoki KISHIMOTO

*Okayama Prefectural Agricultural Experiment Station
1174-1 Koda-oki, Sanyo, Akaiwa, Okayama 709-08, Japan*

Protoplast culture is prepared from cotyledons of Japanese radish (*Raphanus sativus* L. cv. YR-Kurama). Protoplasts formed colonies in B medium lacking Tween 80, followed by the addition of equal volume of C medium containing 1.0 mg/l NAA on the 14th day in culture. Colonies were transferred for further growth onto half strength of MS medium containing 1.0 mg/l NAA and 1.0 mg/l BA. A shoot formation can be induced on shoot regeneration medium (1/2 MS, 0.5% Sucrose, 1.0 mg/l NAA, 1.0 mg/l BA).