



Title	セイヨウハコヤナギ葉肉プロトプラストからの幼植物体の再生
Author(s)	毛利, 武; 三浦, 清
Citation	北海道大學農學部 演習林研究報告, 49(2), 261-275
Issue Date	1992-08
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/21360
Type	bulletin (article)
File Information	49(2)_P261-275.pdf



[Instructions for use](#)

セイヨウハコヤナギ葉肉プロトプラスト からの幼植物体の再生

毛利 武* 三浦 清*

Plantlet Regeneration from Leaf Protoplast of
Populus nigra L. var. *italica* Koehne

By

Takeshi MOHRI* and Kiyoshi MIURA*

要 旨

セイヨウハコヤナギ (*Populus nigra* L. var. *italica* Koehne) 剥皮枝条由来の無菌植物体 (16時間日長, 2000 lx 蛍光灯下で継代培養)の葉から, 1%セルラーゼオノズカ RS, 0.25%ペクトリアーゼ Y-23 を含む 0.6 M マンニトール溶液を用いてプロトプラストを単離した。改変 WPM に 1 μ M NAA, 0.1 μ M BAP 及び 0.6 M マンニトールを添加し, 細胞密度を 2~4 \times 10⁴/ml で培養したときに, 細胞分裂, コロニー状小カルスが誘導された。このコロニー状小カルスを 1 μ M 2, 4-D 及び, 0.8%寒天を添加した WPM に移植し, 16時間日長, 1000 lx 蛍光灯下で培養したところ, 直径 2 から 3 cm の緑色をしたカルスが得られた。このプロトプラスト由来カルスは 0.5 μ M BAP, 5 μ M zeatin を添加した MS 培地に移植し, 2000 lx 蛍光灯下で培養すると不定芽分化が観察された。この不定芽は発根能を有し, 約 10 cm の幼植物体に成長した。

キーワード: プロトプラスト, カルス, 不定芽, 木本性植物

1. 緒 言

植物のプロトプラストを培養すると, 細胞壁を再生し, コロニー, カルスを経て葉や根などの器官に分化し, 1個の植物体となる。これは動物細胞にはない植物細胞に特有の現象であ

1992年3月31日受理 Received March 31, 1992

*北海道大学農学部林産学科林産製造学講座

Laboratory of Chemical Technology of Forest Products, Department of Forest Products, Faculty of Agriculture, Hokkaido University

り、全形性能と呼ばれている。この全形性能により、植物プロトプラストは細胞の段階で細胞融合、遺伝子導入等の操作を施すことによって、その遺伝的な特性を変化させることが可能である。

それらの人為的操作法の1つの細胞融合は、プロトプラストがポリエチレングリコール等の化学物質や電気刺激によりお互いに融合する性質を利用する。そして、お互いには通常の交配ができない種間でも、各個体から分離したプロトプラスト同士を融合させることによって体細胞の雑種細胞が作出できる。この細胞を培養すると、ある特定の条件下で植物体を再生する。これがいわゆる体細胞雑種個体(複2倍体)であって、自然界には全く有り得ない植物体の誕生となる。その際、いわゆる耐病性や耐虫性の獲得等、ある特定の目的を持って新しい植物体を作り出すのが細胞融合の目指すところである。

以上のようなプロトプラストの性質を利用した実験を行うためには、その第一段階としてプロトプラストの培養系の確立が重要となる。しかしながら、木本性植物において、プロトプラストから植物体の分化に成功した報告は草本性植物に比べ少なく、また、その属も限られている。その内の1つがヤマナラシ属(*Populus*)であり、1986年にラッセルらによってハイブリッドポプラ [*P. alba* × *P. gradidentata* 'Crandon,' (NC-5339) 及び *P. nigra* L. 'Betulifolia' × *P. trichocarpa* Torr. and Gray, (NC-5331)] で初めて成功している¹⁾。彼らは、その報告の中で非ハイブリッドポプラはハイブリッドポプラに比べプロトプラストの培養が困難であると述べている。しかし、ここ数年において、非ハイブリッドポプラにおいても、ギンドロ(*P. alba* L.)²⁾、ヤマナラシ(*P. sieboldii* MSC.)³⁾、クロヤマナラシ(*P. nigra* L.)⁴⁾において成功例が報告されている。だが、それらの報告を参考に、同じヤマナラシ属であるセイヨウハコヤナギ葉肉プロトプラストを用い培養を試みたところ、培養初期においてプロトプラストが相互に凝集し、褐変して死滅した。本実験では、培養器にプラスチック24穴シャーレを用い、その培養孔に満たす液量を検討することでプロトプラストの凝集を防ぎ、プロトプラストを培養器に固定化させた。また、種々の培養条件を検討することで、セイヨウハコヤナギ葉肉プロトプラストから細胞分裂、コロニー及びカルス形成に関する知見、更に再生個体を得ることが出来たので報告する。

2. 実 験

2.1 試料

試料は、セイヨウハコヤナギ(*Populus nigra* L. var. *italica* Koehne)の剥皮枝条から直接誘導した不定芽を1 μ M α -naphthaleneacetic acid (NAA)を添加したMurashige and Skoog (MS)寒天培地⁵⁾に16時間日長、2000 lx 蛍光灯下、28 $^{\circ}$ Cの培養条件の下で、継代培養して得られた幼植物体の葉肉組織を用いた⁶⁾。

2. 2 プロトプラストの単離と精製

酵素溶液は1%セルラーゼオノズカ RS (Yakult Pharmaceutical CO., LTD.) と 0.25% ペクトリアーゼ Y-23 (Seishin Pharmaceutical CO., LTD.) を含む 0.6 M マンニトール溶液 (KOH で pH 5.6 に調整) を用いた。

幼植物体の葉は約 0.2 mm 角に切り刻み、0.6 M マンニトール溶液で洗浄した。葉片はただちに、酵素溶液の入った三角フラスコに入れ、暗黒下で、30℃に保ったウォーターバスで 70 回/分の往復振とうにより 3 時間の酵素処理を行った。次いで、プロトプラスト溶液は 40 μ m ナイロンメッシュで濾過後、ネジ付き遠心管に分注し、遠心分離 (100 \times g, 3 分間) を行った。遠心分離終了後、上澄みは除き、新たにサッカロース溶液 [0.6 M サッカロース, 8% デキストラン T 40 (Pharmacia Fine Chemicals CO., LTD.), 5.3 mM CaCl₂] 6 ml を加え懸濁し、その溶液の上に 0.6 M マンニトール溶液 1.5 ml を静かに加えて 2 層をつくり遠心分離 (300 \times g, 10 分間) を行った⁷⁾。遠心分離終了後、2 層の境界線上に集まったプロトプラストを巴斯ツールピペットで別の遠心管に移し、0.6 M マンニトール溶液を加え懸濁し、遠心分離 (100 \times g, 5 分間) を行った。

遠心分離終了後、更に 0.6 M マンニトールの代わりに培養に用いる液体培地で遠心分離 (100 \times g, 3 分間) を 2 回繰り返す、プロトプラストを洗浄し培養に用いた。なお、遠心管中のプロトプラスト密度は血球計算盤を用いて測定した。

2. 3 精製直後のプロトプラストの細胞膜破壊率の測定

プロトプラストの精製が終了後、プロトプラスト懸濁液の 1 部を新たな試験管に移し、等量のエバンスブルー溶液 [2.5% Evans blue (Wako Pure Chemical Industries, LTD.), 0.6 M マンニトール] を混合後、その内の 1 部をピペットでスライドガラスの上に滴下し、光学顕微鏡を用いてプロトプラストの膜破壊率を測定した⁸⁾。なお、細胞膜が破壊されていないプロトプラストは、エバンスブルーを取り込まないため、光学顕微鏡で観察すると光って見える。

2. 4 プロトプラストの培養

2. 4. 1 培地

培地は基本培地として Table 1 に示す woody plant medium (WPM)⁹⁾ のうち硝酸アンモニウムを除き代わりに硝酸カルシウムの濃度を 2 倍にした改変 WPM⁹⁾ を用い、それにホルモンとして 1 μ M NAA 及び 0.1 μ M 6-benzylaminopurine (BAP) と、浸透圧調整物質として 0.6 M マンニトールを加えた。

2. 4. 2 培養液の量

培養器にはプラスチック 24 穴シャーレを用い、1 培養孔 (容積は約 2.3 ml) 当りの培養液の量を 0.5 ml, 1 ml, 2 ml の 3 条件とし、プロトプラスト密度を 2 \times 10⁴ から 4 \times 10⁴/ml とする

Table 1 Comparison of modified WPM with MPM and MS medium

	m-WPM*	WPM	MS
	(mM)	(mM)	(mM)
NH ₄ NO ₃	—	4.95	20.5
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	4.7	2.35	—
KNO ₃	—	—	18.8
K ₂ SO ₄	5.68	5.68	—
CaCl ₂	0.65	0.65	2.98
KH ₂ PO ₄	1.25	1.25	1.25
H ₃ BD ₃	0.1	0.1	0.1
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.001	0.001	0.001
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.5	1.5	1.5
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.1	0.1	0.08(4H ₂ O)
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.03	0.03	0.04(4H ₂ O)
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0001	0.0001	0.00001
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.1	0.1	0.1
Na ₂ -EDTA	0.1	0.1	0.1
CoCl ₂ ·6H ₂ O	—	—	0.0001
KI	—	—	0.005
Sucrose	58.43	58.43	87.65
	(μM)	(μM)	(μM)
Thiamine·HCl	2.96	2.96	0.30
Nicotinic acid	4.06	4.06	4.06
Pridoxine·HCl	2.43	2.43	2.43
Glycine	0.027	0.027	0.027
Folic acid	1.13	—	—
Biotin	0.2	—	—

* : m-WPM; modified woody plant medium

ように調整した。

2. 4. 3 培地交換

細胞分裂を促進するためには、浸透圧調整物質の濃度を下げながら培地を交換する必要があるという報告¹⁾を参考に、浸透圧調整物質(本実験の場合マンニトール)の量を前培地と比較して0.1 M ずつ減らした以外は同組成の培地で、培養開始後10日ごと、20日ごと、30日ごとに培地交換し、その最適期間を調べた。

なお、培養はすべて暗黒下、28℃で行った。

2. 5 プロトプラスト由来カルスの増殖

2. 5. 1 カルス増殖用培地

カルス増殖には、9 cm 径深型プラスチックシャーレを用いた。培地は、WPM もしくは改変 WPM にホルモンとして1 μM NAA+0.1 μM BAP、1 μM 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)、0.5 μM NAA+0.5 μM 2,4-D+0.1 μM BAP 及び0.8%の寒天を添加したものをを用いた。

2. 5. 2 照度による影響

培養は、暗黒下あるいは16時間日長、1000、1500、2000 lx 蛍光灯下の4条件で行いプロトプラスト由来カルス増殖の最適照度を調べた。

なお、培養はすべて28℃で行った。

2. 6 プロトプラスト由来カルスからの不定芽分化

不定芽分化にはWPMあるいはMS培地にホルモンとして0.1 μM NAA+5 μM BAP+0.5 μM zeatin, 0.1 μM NAA+0.5 μM BAP+5 μM zeatin, 5 μM BAP+0.5 μM zeatin, 0.5 μM BAP+5 μM zeatin 及び0.8%寒天を添加した。なお培養は、16時間日長、2000 lx 蛍光灯下、28℃で行った。

3. 結果及び考察

3. 1 プロトプラストの単離と精製

単離直後のプロトプラストをPhoto. 1に示す。直径は約25 μmから40 μmに分布し、葉緑体が発達しているのが観察された。なお、サッカロース溶液による2層密度勾配遠心法は破裂したプロトプラストや細胞破片を取り除くのに効果的であった。

3. 2 精製直後のプロトプラストの細胞膜破壊率の測定

光学顕微鏡下でエバンスブルー溶液中のプロトプラストを観察すると、95%の光っているプロトプラストが測定された(Photo. 2)。従って、精製直後のプロトプラストの細胞膜破壊率は5%と判断した。なお、筆者らの以前の報告で¹⁰⁾2層密度勾配法を用いない場合にはプロトプラストの細胞膜破壊率は30%であり、サッカロース溶液による2層密度勾配法を用いたプロトプラスト精製法は、細胞膜が破壊されていないプロトプラストをより高い比率で集めることに関して有効であると判断した。

3. 3 プロトプラストの培養

3. 3. 1 培養液の量

培養器に満たす液量が0.5 ml (培養孔容積の約21%)、1 ml (培養孔容積の約43%)では、プロトプラストは培養開始1日以内にお互いに凝集し、1度も細胞分裂を起こすことなく褐色化し、死滅した。培養14日目の凝集した状態を示す(Photo. 3)。

液量を2 ml (培養孔容積の約87%)とした場合は、プロトプラストはお互いに凝集することなく、培養開始3、4日後に細胞分裂を開始した。Photo. 4に培養7日目の細胞分裂の状態を示す。最適時期での培地交換により、その後連続した細胞分裂が起き、培養開始30日目にはコロニーを形成し(Photo. 5)、培養開始45日目にはコロニー状小カルスを形成するに至った(Photo. 6)。それらコロニー状小カルスは、カルス増殖用の培地に移植した(Photo. 7)。

培養孔に満たす液量を多くすることは、プロトプラストを安定化させることと同時に、培養液からの水分の蒸発による浸透圧の上昇による影響を少なくする利点があったと思われる。

3. 3. 2 培地交換

まず、培地を10日毎に交換した場合、前記のように細胞は盛んに分裂を起こして30日目にはコロニーを形成し、45日目にはカルスを形成するに至った。20日毎に培地を交換した場合は、細胞分裂を継続しコロニーを形成するに至ったが、コロニー形成時期が培養約45日目であり、形成率も低かった。30日毎に培地を交換した場合は、細胞分裂を継続することなくコロニー形成に至らなかった。これらの結果は、活発な細胞分裂を継続させるためには、周りの培地の浸透圧を下げて細胞の膨圧を高めることが必要であるということが考えられる。また、細胞自身が培地中に放出する代謝物が、細胞を阻害する可能性を考えると、培地交換によりその影響を少なくしたと思われる。

3. 3. 3 プロトプラスト由来カルスの増殖

Table 2は、培地24条件について、培地移植後1カ月後のカルスの縦、横、鉛直方向の平均直径の測定結果である。WPMにホルモン条件Cつまり、 $1\mu\text{M}$ 2,4-Dを加えた場合に最もカルスの直径が増加したことが分かる(Photo. 8, 9)。また、照度については、1000 lx 蛍光灯下で培養した場合に最も良い結果が得られた。これは、それまでの液体培養が暗黒下で行われていたので、順化という面からも直接強光にさらすよりも弱光での培養が好ましいと推察される。

なお、改変WPMを用いた場合は、暗黒下に限り、ホルモン条件A、つまり $1\mu\text{M}$ NAA + $0.1\mu\text{M}$ BAPを加えた場合、良好なカルス増加が観察された(Photo. 10)。これは、寒天培地上での培養条件がプロトプラストがコロニー状小カルスを形成した液体培養条件と培地、ホルモン、光をあてない条件と全てが同じ条件であった為であったと考えられる。ここで注目すべきことは、Table 2における条件の内、WPM+ホルモンAのうち、1000, 1500, 2000 lxで培養したものは、この後、更に2週間で、つまり培地に移植してから6週間後に不定芽の分化が観

Table 2 Effect of intensity of light, combination of media and hormones on proliferating microcallus derived from leaf protoplast (30days after being transferred to agar medium)

	WPM+A	m-WPM+A	WPM+B	m-WPM+B	WPM+C	m-WPM+C
dark	+	++++	+	+	++++	+
1000 lx	++	+++	++	+	+++++	+
1500 lx	+	++	++	+	++++	+
2000 lx	+	++	++	+	++++	+
A; $1\mu\text{M}$ NAA+ $0.1\mu\text{M}$ BAP					+	= ~ 3 (mm)*
B: $0.5\mu\text{M}$ NAA+ $0.5\mu\text{M}$ 2,4-D+ $0.1\mu\text{M}$ BAP					++	= 3~6 (mm)
C; $1\mu\text{M}$ 2,4-D					+++	= 6~9 (mm)
					++++	= 9~12(mm)
m-WPM; modified woody plant medium					+++++	=12~ (mm)

*; Size of callus (the average X-axis, Y-axis width values, and height values)

察された。しかし、それらの不定芽は茎の伸長がおこらず、その後、同組成の培地あるいは発根培地 (MS 培地+0.1 μM NAA) に移植してみたがいずれも茎の伸長は観察されず、やがて褐変し死滅した。

3. 4 プロトプラスト由来カルスからの不定芽分化

実験に用いたカルスは、前記のカルス増殖条件の内、WPM+ホルモン条件 C つまり、1 μM 2,4-D で 1000 lx 蛍光灯下で培養したもの (以後 α とする) と、改変 WPM+ホルモン条件 A つまり、1 μM NAA+0.1 μM BAP で暗黒下で培養したもの (以後 β とする) の 2 種類を用いた。このカルスを 2 種類の培地 (MS, WPM) を用いて、カルス×培地 (I, II, III, IV) を設定した。不定芽分化のためのホルモンは 4 条件 (D, E, F, G) とした。なお、いずれの場合も、不定芽分化用培地に移植した時期は、カルス増殖培地移植後 1 カ月目である。

不定芽分化の結果をカルスから不定芽が形成された日数で表示した (Table 3)。基本培地としては WPM に比べ MS 培地を用いた方が不定芽の分化も早く、その後の成長も良かった。また、ホルモン条件としては、F ないし G を用いた場合に、より短い期間で不定芽分化が観察された。これは、サイトカイニンとしては BAP よりも zeatin を主とした組合せの方が良いということを示している。最後に、用いたカルスの前培養条件としては明らかに α の方が β よりも良い結果が得られた。この原因としては、両者は基本培地、ホルモン、照度がすべて違っているのでどれが原因かということ特定するのは更に検討が必要であるが、原因の 1 つとして α

Table 3 Effect of combinations of media and hormones on the period of differentiating shoots from callus derived from leaf protoplast

	I (MS, α)	II (MS, β)	III (WPM, α)	IV (WPM, β)
D	25 day	—	—	—
E	23 day	43 day	—	—
F	16 day	31 day	25 day	—
G	14 day	25 day	30 day	—

I : Callus cultured on WPM with 1 μM 2,4-D under an illumination of 1000 lx, and transferred to MS medium.

II : Callus cultured on modified WPM with 1 μM NAA and 0.1 μM BAP in the dark, and transferred to MS medium.

III : Callus cultured on WPM with 1 μM 2,4-D under an illumination of 1000 lx, and transferred to WPM.

IV : Callus cultured on modified WPM with 1 μM NAA and 0.1 μM BAP in the dark, and transferred to WPM.

D~F : combinations of hormones added agar medium to differentiate shoots.

D : 5 μM BAP+0.5 μM zeatin+0.1 μM NAA.

E : 5 μM BAP+0.5 μM zeatin.

F : 0.5 μM BAP+5 μM zeatin+0.1 μM NAA.

G : 0.5 μM BAP+5 μM zeatin.

— : No shoots differentiated.

は1000 lx 蛍光灯下、 β は暗黒下で培養により、 α の条件ではクロロフィルつまり葉緑体がすでに形成されていたことが考えられる。つまり、分化用培地に移植した時点で β は褐色に近い色のカルスであることから葉緑体は未だ形成されていない状態にあり、形成されるまでの期間が影響していることが推察される。なお、本実験で得られた不定芽は発根能を有し、約10 cmの幼植物体に成長した (Photo. 11, 12)。

4. 総 括

今回の実験の範囲内でプロトプラスト由来カルスから不定芽誘導を導く最適条件は、プロトプラストの液体培養においては、培養器を満たす液体培地の量はできるだけ多くし、培地交換は10日毎に行うこと。カルス増殖にはWPMにホルモンとして $1\mu\text{M}$ 2, 4-Dを加えた寒天培地を用い、1000 lx 蛍光灯下で培養する。また、不定芽分化にはMS培地にホルモンとして $0.1\mu\text{M}$ NAA+ $0.5\mu\text{M}$ BAP+ $5\mu\text{M}$ zeatin、もしくは $0.5\mu\text{M}$ BAP+ $5\mu\text{M}$ zeatinを加えた寒天培地を用いることである。

また、本実験で得られた培養系を用い、同じヤマナラン属のギンドロのカルスプロトプラストの培養を試みたところ、ギンドロカルスプロトプラストは活発に細胞分裂し、コロニーを形成した^{11), 12)}。このことは、セイヨウハコヤナギ葉肉プロトプラストで得られた培養系が、種を代えても有効である可能性を示唆している。

以上より、本実験で得られたプロトプラスト培養系は、セイヨウハコヤナギ葉肉プロトプラスト及びギンドロカルスプロトプラストの細胞融合による体細胞雑種個体作出を目的とした実験を可能とした。なお、葉肉組織及びカルスをプロトプラストの試料として用いることは、顕微鏡下で、葉緑体が発達したセイヨウハコヤナギ葉肉プロトプラストは緑色に、葉緑体が発達していないギンドロカルスプロトプラストは白色に観察されることから、細胞融合を行った際にヘテロプロトプラストを識別するのが容易である利点がある。

更に実験を進め、融合物の培養が成功し、再生個体を得ることができたならば、そのときにはセイヨウハコヤナギとギンドロの体細胞雑種が作出することになる。その体細胞雑種の中には、それぞれの長所(例えば、セイヨウハコヤナギの成長の早さとギンドロの耐虫性)を持ったものも含まれる可能性があり、より価値のある林木が生み出されることになる。

謝 辞

本研究を行うにあたり、講座の全構成員の協力を得たことに謝意を表する次第である。さらに本研究の一部は武田科学振興財団の研究奨励金によって行われたものである。

参 考 文 献

- 1) Rusell, J. A.; McCown, B. H.: Plant cell reports, 7, 59-62 (1988).
- 2) Sasamoto, H. et al.: J. Jpn. For. Soc. 71 (11), 499-455 (1989).
- 3) 笹本浜子ほか4名: 第100回日本林学会発表論文集, 東京, 1989, p. 531.
- 4) Lee, J. S. et al.: Res. Rep. Inst. For. Gen., Korea, 23, 143-148 (1987).
- 5) Murashige, T.; Skoog, F.: Physiol. plant, 15, 473-497 (1962).
- 6) 毛利武; 三浦清: 日本木材学会北海道支部講演集, 札幌, No. 22, 44-48 (1990).
- 7) 斎藤明: "木本性植物の増殖と育種", 農業図書, 1989, P. 190.
- 8) Kanai, R.; Edwards, G. E.: Plant Physiol., 52, 484 (1973).
- 9) Lloyd, G. B.; McCown, B. H.: Proc. Inc. Proc. Int. Plant Prop. Soc, 30, 421-427 (1981).
- 10) 毛利武; 三浦清: 第41回日本木材学会大会要旨集, 松江, 1991, P. 439.
- 11) 毛利武; 三浦清: 第42回日本木材学会大会要旨集, 名古屋, 1992, P. 6.
- 12) 毛利武: 平成4年度北海道大学大学院農学研究科林産学専攻修士課程修士論文.

Summary

Using 1% Cellulase Onozuka RS and 0.25% Pectolyase Y-23 in 0.6 M mannitol, protoplasts were isolated from the leaves of sterile plantlets derived from peeled twigs of *Populus nigra* L. var. *italica* Koehne. Sterile plantlets were grown under illumination of 2000 lx for 16 h per day. Microcallus was induced by a modified woody plant medium (WPM) that contained no ammonium ions but included $1\ \mu\text{M}$ α -naphthaleneacetic acid, $0.1\ \mu\text{M}$ 6-benzylaminopurine (BAP) and 0.6 M mannitol when protoplasts were inoculated at a cell density of $2\sim 4\times 10^4/\text{ml}$. Protoplast-derived microcallus developed into a green callus of about 3 cm in diameter when transferred to an agar solidified WPM, supplemented with $1\ \mu\text{M}$ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and placed under illumination of 1000 lx for 16h per day. Shoots began to differentiate at about two weeks after transplanting the protoplast-derived callus on a Murashige and Skoog medium with $0.5\ \mu\text{M}$ BAP, $5\ \mu\text{M}$ trans-zeatin under illumination of 2000 lx for 16h per day. These shoots rooted and developed into plantlets of about 10 cm in height.

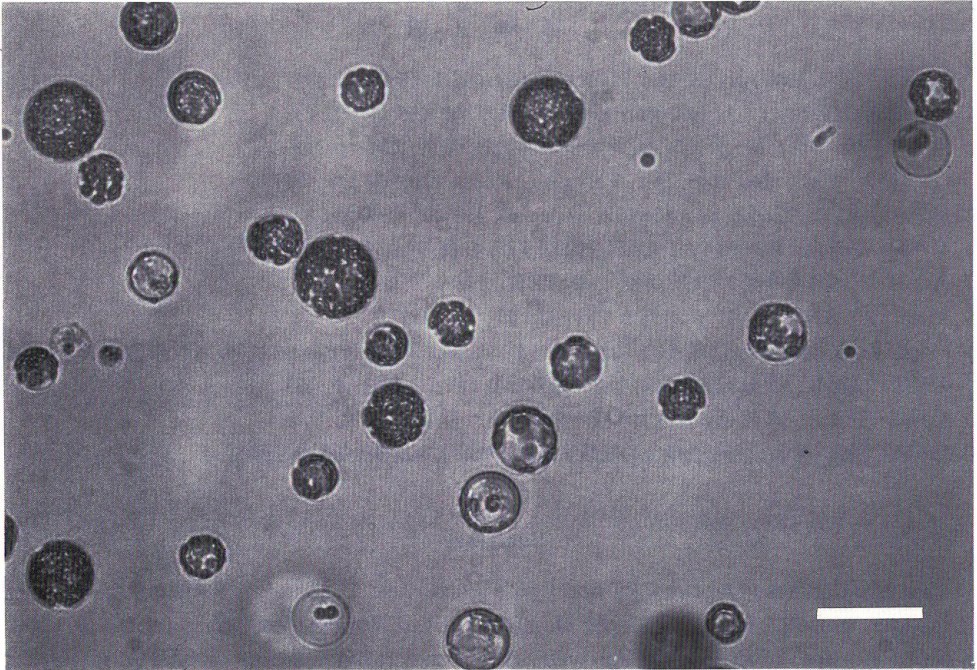


Photo. 1 Freshly prttoplasts isolated from mesophyll cell (bar=50 μ m)

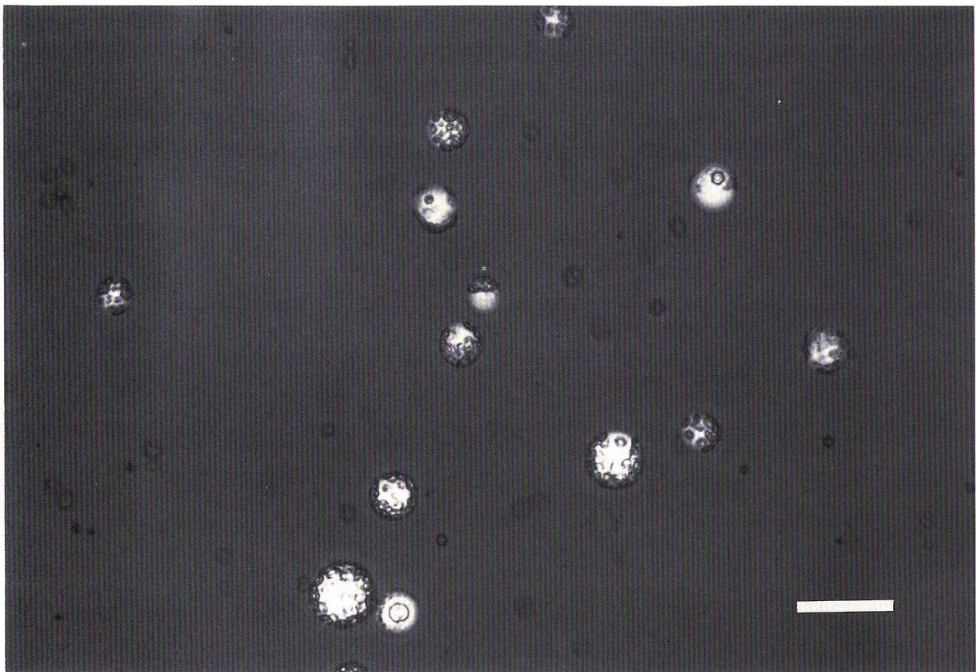


Photo. 2 Leaf protoplasts in Evans blue solution (bar=50 μ m)

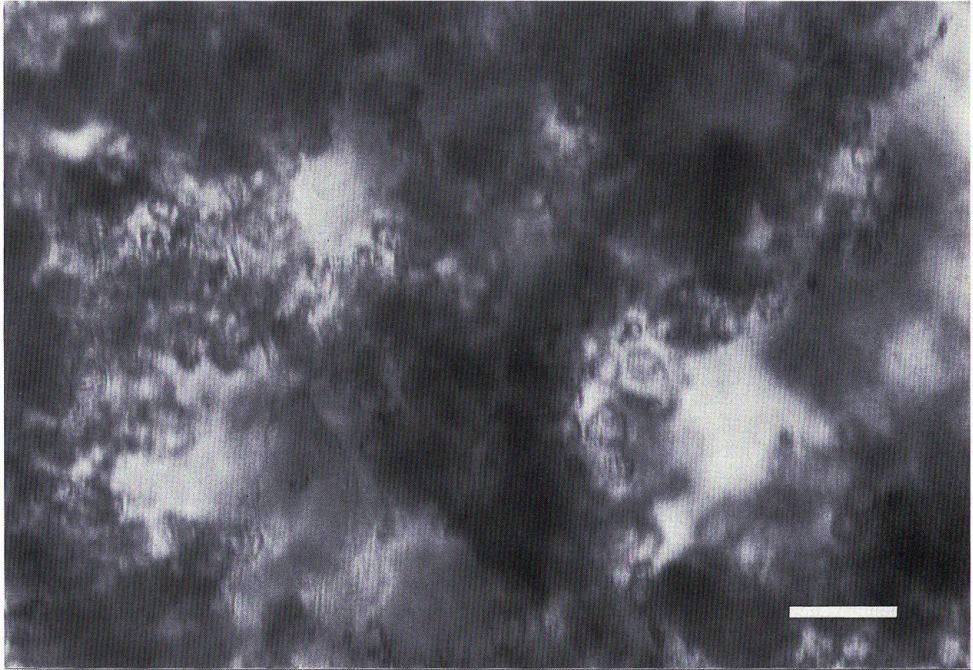


Photo. 3 Formation of aggregated protoplasts after 14 day culture (bar=100 μm)

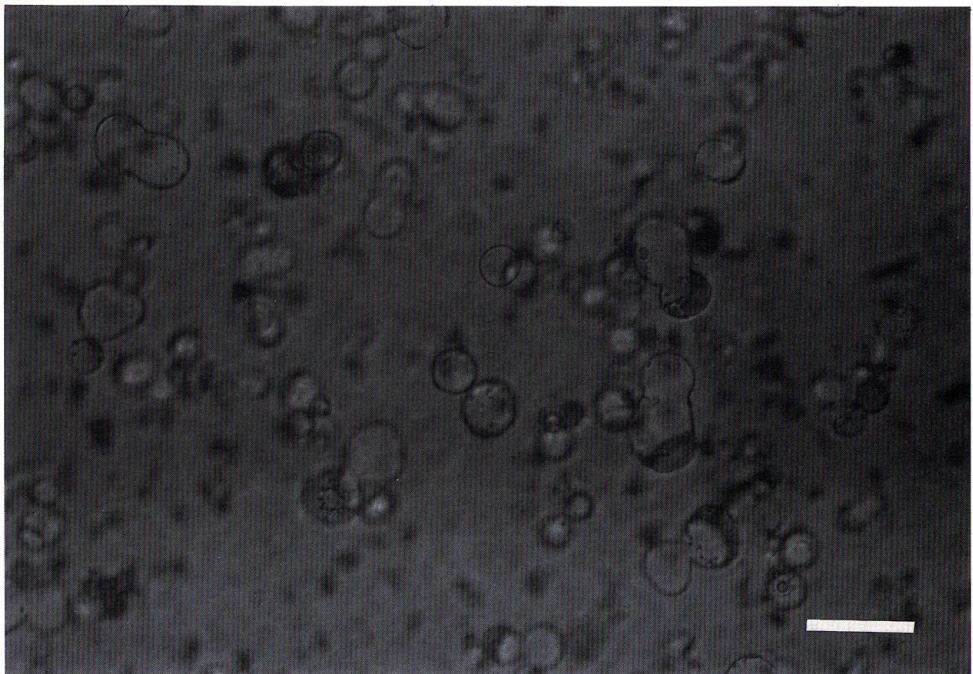


Photo. 4 First division of cell derived from leaf protoplasts after 7 day culture
(bar=50 μm)

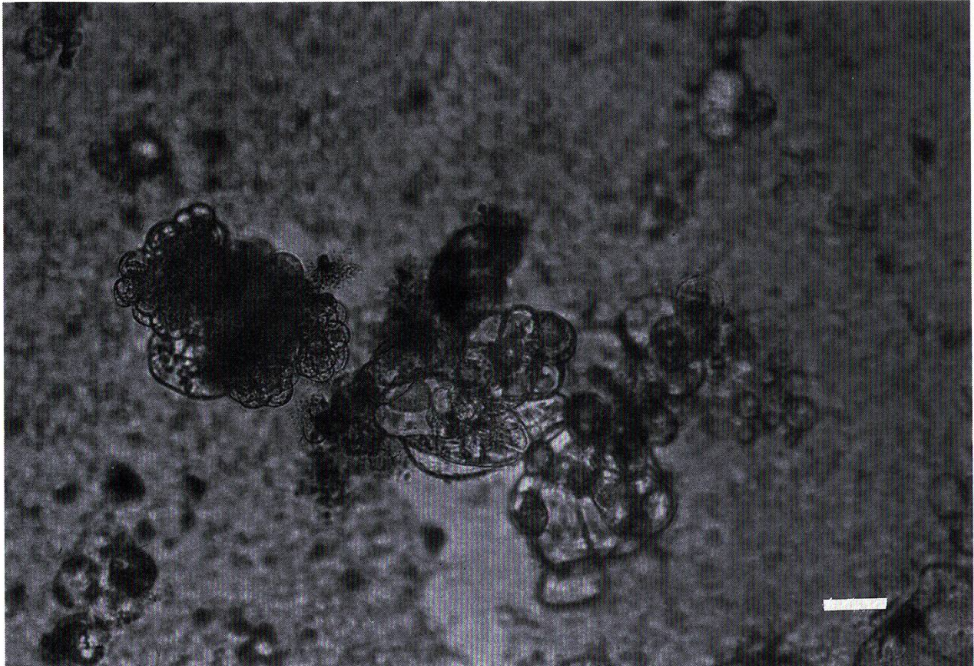


Photo. 5 Colony formation of protoplasts after 30 day culture (bar=100 μm)

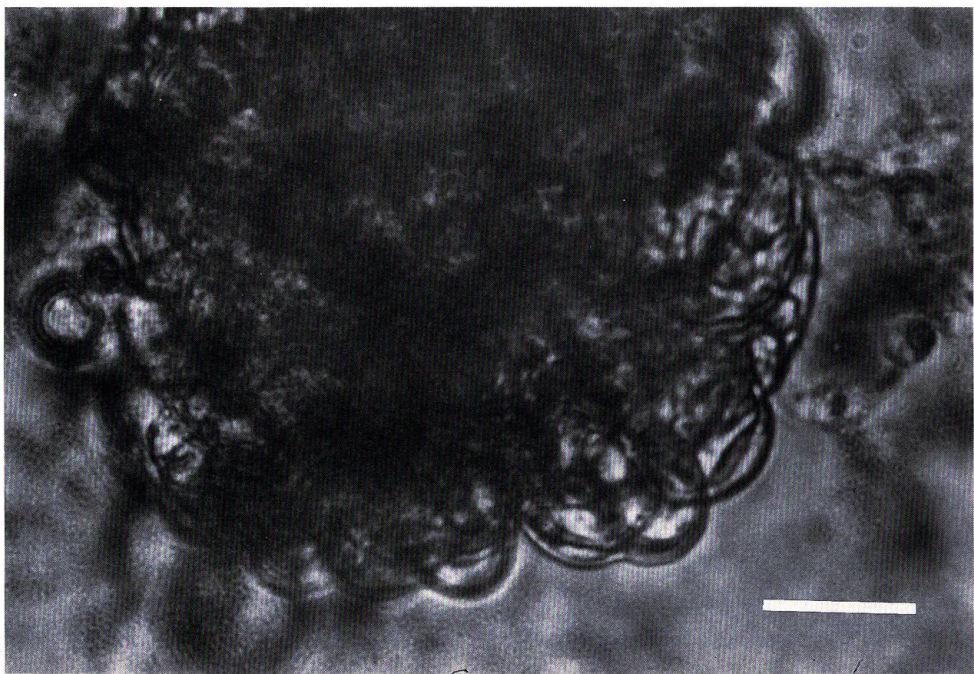


Photo. 6 Microcallus formation of protoplasts after 45 day culture (bar=100 μm)

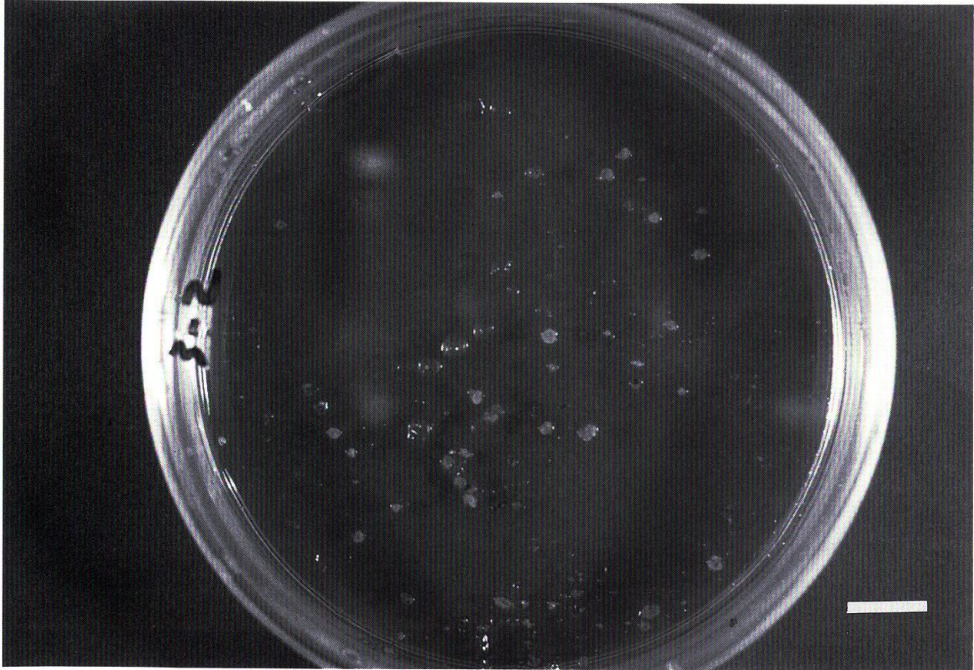


Photo. 7 Microcallus transferred to agar medium for proliferation after 45 day culture (bar=1 cm)

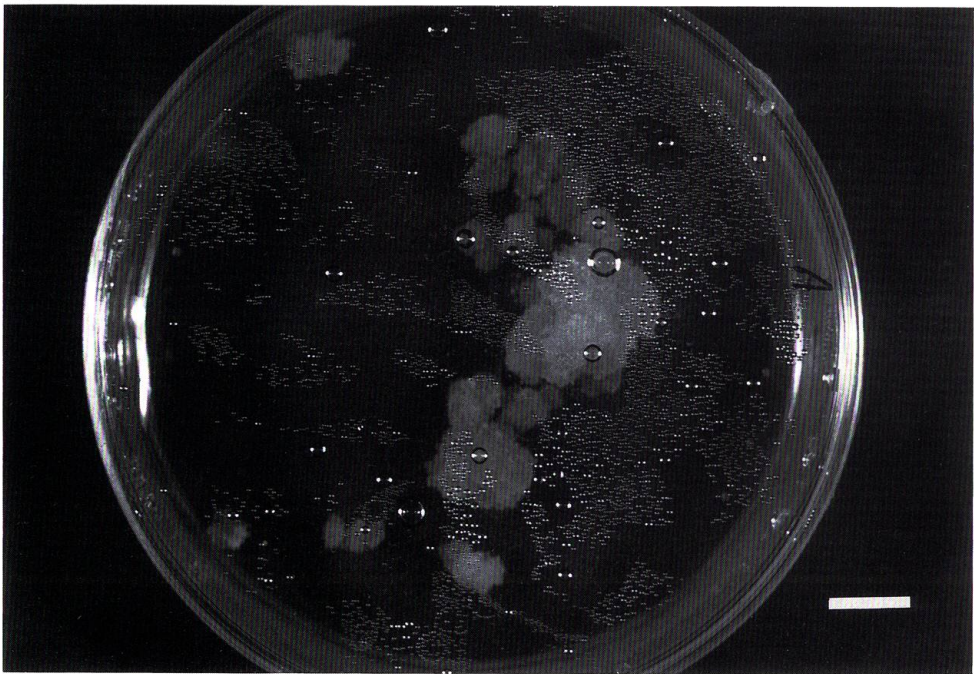


Photo. 8 Proliferation of calli on WPM with $1\mu\text{M}$ 2,4-D under an illumination of 1000 lx (bar=1 cm)

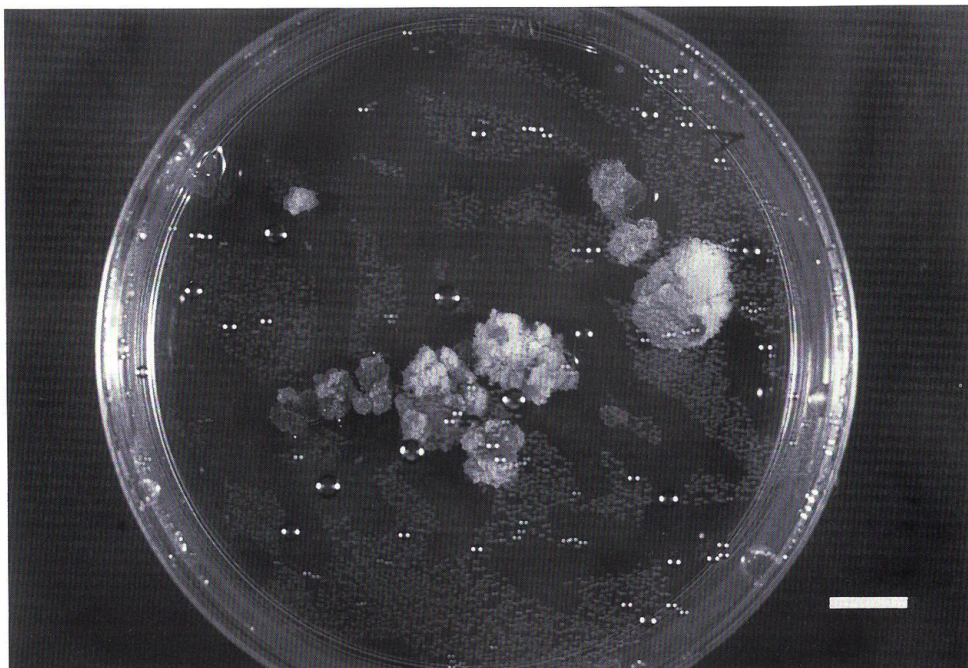


Photo. 9 Proliferation of calli on WPM with $1\mu\text{M}$ 2,4-D under an illumination of 2000 lx (bar=1 cm)

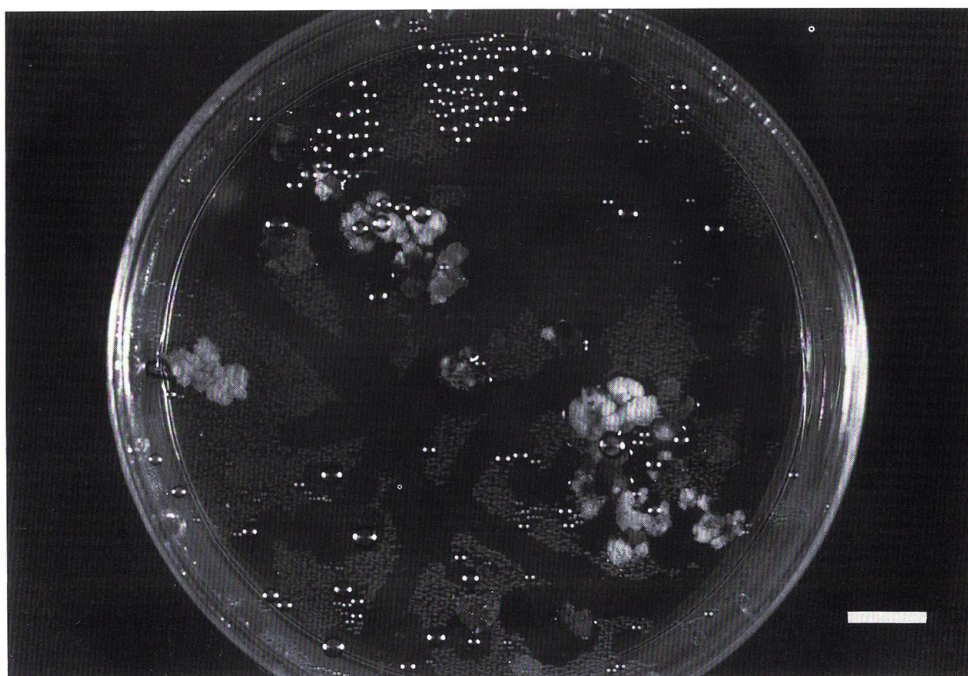


Photo. 10 Proliferation of calli on modified WPM with $1\mu\text{M}$ NAA and $0.1\mu\text{M}$ BAP in the dark (bar=1 cm)

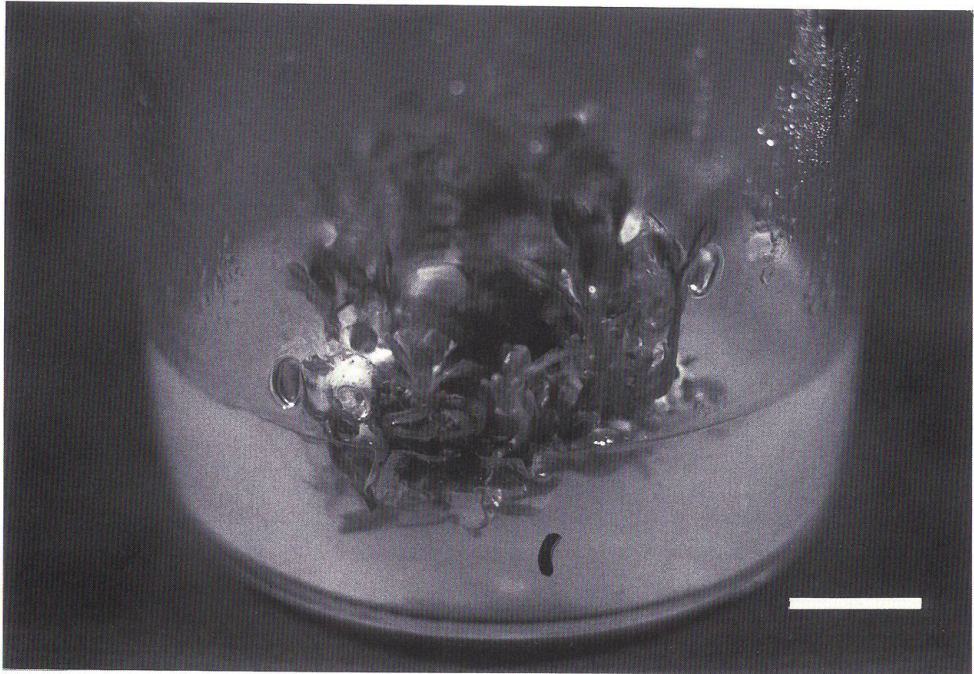


Photo. 11 Shoots formation from callus 14 days after transferred to MS medium with $0.5 \mu\text{M}$ BAP and $5 \mu\text{M}$ zeatin (bar=1 cm)

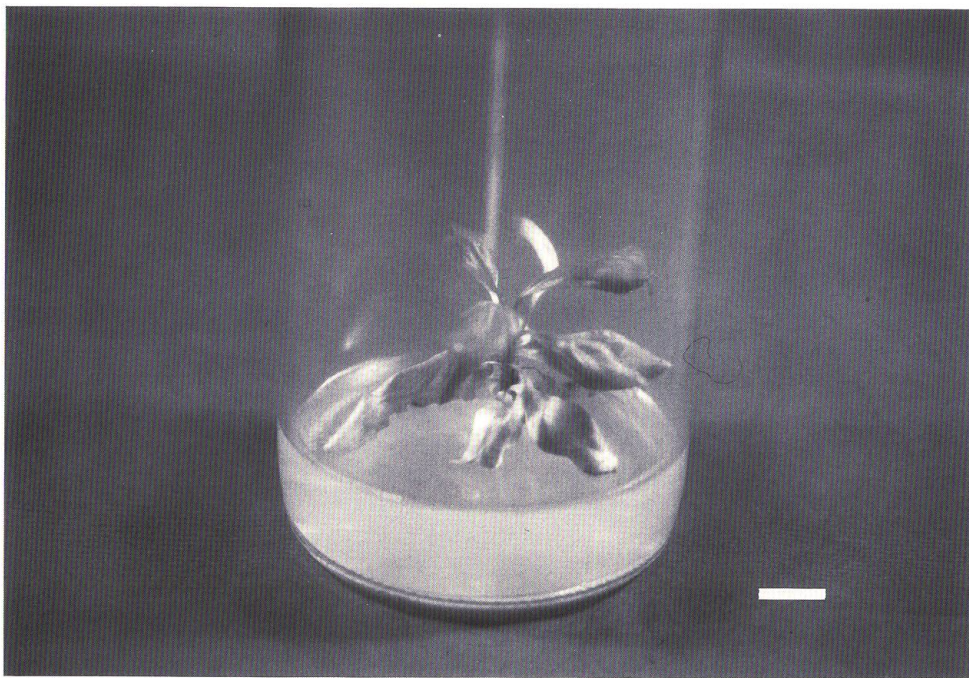


Photo. 12 Rooted plantlet derived from leaf protoplast (bar=1 cm)