マルバアサガオ *Ipomoea purpurea* の葉肉プロトプラストの単離と培養

石黒紘規¹・仁田坂 英二²・大谷基泰^{1*}

¹ 石川県立大学 921–8836 石川県野々市市末松 1–308

² 九州大学理学部 819–0395 福岡県福岡市西区元岡 744

Isolation and Culture of Mesophyll Protoplasts of Common Morning Glory (*Ipomoea purpurea*)

Hiroki ISHIKURO¹, Eiji NITASAKA² and Motoyasu OTANI^{1*}

¹Research Institute for Bioresources and Biotechnology, Ishikawa Prefectural University, Nonoichi, 921–8836

²Department of Biological Science, Graduate School of Science, Kyusyu University, Fukuoka, 812–8581

Abstract

This study investigated conditions for the isolation and culture of mesophyll protoplasts of common morning glory (*Ipomoea purpurea*). Sterile seedlings of three genotypes on the 10th day after sowing *in vitro* were tested. Leaf blades of *in vitro* seedling plants were treated with isolation enzyme solution containing 1 % Cellulase Onozuka R-10 and 0.3 % Pectolyase Y-23 yielded $6.3 \times 10^6 - 9.2 \times 10^6$ protoplasts g^{-1} of fresh leaf blade. The isolated protoplasts were cultured at an initial density of 1×10^5 protoplasts ml^{-1} in a modified LS liquid culture medium. First cell division occurred in 2 – 3 days. An initial division frequency of 26 % was obtained in culture medium supplemented with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and kinetin. Colony and microcallus formation from these protoplast were achieved. Some of the calli transplanted onto regeneration medium produced adventitious roots.

Keywords: colony formation; *Ipomoea purpurea*; mesophyll protoplast; morning glory; protoplast isolation

緒 言

ニホンアサガオ (*Ipomoea nil*), マルバアサガオ (*I. purpurea*) およびソライロアサガオ (*I. tricolor*) は広く世界で栽培されているアサガオ類の園芸種である。著者らはこれらのアサガオ類の中でも生育が旺盛で開花期間が長いことや落葉しづらい性質を持つマルバアサガオとソライロアサガオに注目しており、これら2種における植物バイオテクノロジーを利用した新品種の開発を目指している。これら2種のアサガオに

は黄花やオレンジ色の花色を持つ品種が無く、芳香性も持たない。さらに葉色や葉形の変化に乏しいなどの育種上の課題が多くある。一方で、これら2種の近縁種には黄色や橙色の花色を持つ種や良い香りを持つ種、他、花形や葉形の変異に富む種が幾つか存在するためにそれらはアサガオ類の園芸種の新たな遺伝資源として期待できる。しかし、これらの有用な形質を持つ近縁種との間では上述した2種は交配することができない。そこで、この交雑障壁を打破するために細胞融合によって体細胞雑種を作成することが期待されている。観賞用の園芸種以外の *Ipomoea* 属植物では、いくつかの種においてプロトプラストの単離と培養についての報告例がある(サツマイモ (*I. batatas*)^{1,2)}, ホシアサガオ (*I. triloba*)³⁾, マメアサガオ (*I. lacunosa*)⁴⁾, モミジヒルガオ (*I. cairica*)⁵⁾, エンサイ (*I. aquatica*)⁶⁾)。しかしながら、重要な観賞用園芸種であるマルバアサガオやソライロアサガオ、ニホンアサガオに

2018 年 1 月 18 日受付

2019 年 6 月 13 日受理

*Corresponding author: Motoyasu Otani

(otani@ishikawa-pu.ac.jp)

についてはこれまでに報告例は無い。

本研究ではマルバアサガオの葉肉プロトプラストの単離条件を明らかにした。つづいて、単離されたプロトプラストの培養に用いる培地条件と培地供給法について検討した結果、小カルス形成と不定根分化を可能にする培養法を初めて明らかにした。

材料および方法

1. 植物材料

本研究ではマルバアサガオの3系統（IP006（石川県立大学保存系統）、Q81およびQ1123（共に九州大学保存系統））を供試した。各系統の種子を常法に従って殺菌消毒後、植物成長調整剤を含まない Linsmaier and Skoog (LS)⁷⁾ 培地（3% (w/v) ショ糖と0.25% (w/v) gellan gum（三栄源エフ・エフ・アイ（株））を含む）上へ播種し、26℃、白色蛍光灯を用い14時間日長、光合成量子束密度を約 $38 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で培養した。播種後約10日目の無菌実生の展開葉を供試した。

2. プロトプラストの単離

無菌実生の展開葉を3–5 mm 角に切断してから酵素溶液中に浸して、26℃、暗黒条件下で16時間、30 rpm で巡回振盪処理した。効率的にプロトプラストを単離するためにセルラーゼとペクチナーゼの種類と濃度を変更した3種類の酵素溶液を比較検討した。単離実験は2回以上繰り返しておこなった。酵素溶液 E1 は1% (w/v) Cellulase Onozuka R-10 と0.3% (w/v) Pectolyase Y-23 を添加し、酵素溶液 E2 は1% (w/v) Cellulase Onozuka R-10 と0.3% (w/v) Macerozyme R10 を添加し、そして酵素溶液 E3 は2% (w/v) Cellulase Onozuka R-10 と0.3% (w/v) Pectolyase Y-23 を添加した（Table 1）。全ての酵素溶液の pH 値を5.6 に調整した。酵素処理後、50 μm のボアサイズを持つナイロンメッシュに通して未消化の残渣などを取り除いてから、W₅ 溶液⁸⁾ に懸濁し、800 rpm で3分間の遠心処理をした。遠心処理後、沈殿物を0.6 M ショ糖溶液で再懸濁した後再

び、800 rpm で3分間の遠心処理をした。遠心処理後、ショ糖溶液の上層部に形成されたプロトプラストから成る緑色のバンドを滅菌スポイト（CA2000、栄研化学（株））を使って新しい遠心管に移して、再び W₅ 溶液に懸濁して800 rpm で3分間遠心処理することによってプロトプラストの精製をおこなった。遠心処理は全て室温でおこなった。プロトプラストの観察は倒立顕微鏡（CK2, OLYMPUS, 日本）を使い40倍～200倍でおこなった。

3. プロトプラスト培養

単離・精製したプロトプラストの密度を 1.0×10^5 個 ml^{-1} に調整して培養をおこなった。培養は3段階に分けておこない、各段階における培地を培養開始時から順に L1 培地、L2 培地そして L3 培地とした。L1 培地に添加するオーキシンの条件がプロトプラストの分裂に及ぼす効果について検討した。L1 培地は無機塩の濃度のみを半分にした LS 培地に、1% (w/v) ショ糖、0.6 M D-マンニトール、0.5 mg l^{-1} 葉酸、0.05 mg l^{-1} ビオチン、50 mg l^{-1} カゼイン加水分解物、0.25–0.5 mg l^{-1} のオーキシン様植物成長調整剤（2,4–ジクロロフェノキシ酢酸（2,4-D）、ナフタレイン酢酸（NAA）、4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid (picloram)（シグマ–アルドリッチ）、4–フルオロフェノキシ酢酸（4FA）（シグマ–アルドリッチ）、3–インドール酪酸（IBA）（ナカライテスク（株））、5,6-dichloro-3-indoleacetic acid (5,6-IAA)（和光純薬工業（株））、3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid (dicamba)（和光純薬工業（株））および1 mg l^{-1} kinetin（ナカライテスク（株））を添加したものを用いた。L2 培地は L1 培地の成分のうちショ糖を2% (w/v) に、D-マンニトールを0.3 M に変更したものを用いた。L3 培地は LS 培地に0.25–0.5 mg l^{-1} オーキシン様植物成長調整剤、1 mg l^{-1} kinetin および3% (w/v) ショ糖を添加したものを用いた。L1 から L3 の全ての培地は液体培地として用いた。最初にプロトプラストを含む L1 培地 5 ml を6 cm 径のプラスチックシャーレ内で26℃、暗黒条件下、30 rpm で巡回振盪培養した。その後1週間毎に同組成の新鮮な培地を2 ml ずつ添加して3週間培養した後に、L2 培地を2 ml 添加してから、再び

Table 1 Composition of enzymatic solution for mesophyll protoplast isolation.

Composition	Enzymatic solutions		
	E1	E2	E3
Cellulase Onozuka R-10	1.0% (w/v)	1.0% (w/v)	2.0% (w/v)
Pectolyase Y-23	0.3% (w/v)	-	0.5% (w/v)
Macerozyme R-10	-	0.3% (w/v)	-
D-mannitol	0.5 M	0.5 M	0.5 M
MES*	5.0 mM	5.0 mM	5.0 mM
pH	5.6	5.6	5.6

*MES: 2-Morpholinoethanesulfonic acid, monohydrate.

1週間毎に新鮮なL2培地を2 ml ずつ添加していき3週間培養した。次に、L3培地を2 ml 加え、以降も同様に1週間毎に新鮮なL3培地を添加していき3週間培養した。培養開始9週間後に、形成された小カルスをカルス増殖培地上に移植した。カルス増殖培地はL3培地に0.32% (w/v) gellan gumを添加したものをを用いた。その後、5 mm 前後の大きさに増殖したプロトプラスト由来カルスを順次再分化培地に移植した。再分化培地はLS培地に種々のサイトカイニン様植物成長調整剤 (6-benzylaminopurine (BA) (ナカライテスク(株)), 1-phenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)urea (TDZ) (和光純薬工業(株)) もしくは zeatin (ZEA) (和光純薬工業(株))) とインドール酢酸 (IAA) を組み合わせて添加した6種類を用いた。再分化培地上での培養は26℃、白色

蛍光灯を用い14時間日長、光合成光量子束密度を約 $38 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ でおこなった。

結果と考察

1. プロトプラストの単離

マルバアサガオの系統 IP006 を材料にしてプロトプラストの収量を3種類の酵素溶液を用いて比較したところ、各酵素液における葉片 1 g 新鮮重当たりのプロトプラスト収量は、酵素溶液 E1 では平均 9.2×10^6 個、E2 では平均 1.7×10^6 個、E3 では平均 1.1×10^7 個となり、E1 と E3 が高いプロトプラスト収量を示した。しかしながら、酵素溶液 E3 では単離したプロトプラストでは萎縮するなどの変形が観察されたことからプロ

Fig. 1 Isolation and culture of mesophyll protoplasts of *Ipomoea purpurea* Q1123. (a) Freshly isolated protoplasts using enzymatic solution containing 1 % Cellulase Onozuka R-10 and 0.3 % Pectolyase Y-23; (b) dividing protoplasts after 3 days of culture in L1 medium supplemented with 2,4-D and kinetin. Bar represents 100 μm .

トプラスト収量がほぼ同程度である酵素溶液 E1 を以降の実験では用いることにした。酵素溶液 E1 を用いた場合のマルバアサガオ各系統における葉片 1 g 新鮮重当たりの平均プロトプラスト収量は、IP006 では 9.2×10^6 個、Q81 では 6.8×10^6 個として Q1123 では 8.3×10^6 個であった。また、以降のプロトプラストの培養実験では種子数に余裕のある Q1123 を用いた。

2. プロトプラストの培養

酵素溶液 E1 によって単離した新鮮な Q1123 の葉肉プロトプラスト (Fig. 1a) を培養したところ、培養開始 2–3 日目には第一細胞分裂が確認でき (Fig. 1b)、4–5 日目には第二細胞分裂も認められた。そこで、まず Q1123 の葉肉プロトプラストを用いて培地に添加するサイトカニン様植物成長調整剤の効果を検討するために、 0.5 mg l^{-1} 2,4-D に 3 種類の 1 mg l^{-1} のサイトカニン様植物成長調整剤 (BA, kinetin, TDZ) を組み合わせた L1 培地で培養した。培養 1 週間後のプロトプラストの細胞分裂率は kinetin を含む培地では 26.1 ± 4.0 (標準偏差 (SD), 以下同) % となり、最も高かった。BA もほぼ同等の効果を示した (26.0 ± 5.5 %)。一方で、TDZ は最も効果が低かった (19.8 ± 3.4 %)。

次に、オーキシン様植物成長調整剤の効果を検討するために、 1 mg l^{-1} の kinetin に 0.5 mg l^{-1} の 7 種類のオーキシン様植物成長調整剤 (2,4-D, NAA, picloram, 4FA, IBA, 5,6-IAA, dicamba) をそれぞれ組み合わせて添加した。L1 培地に分裂率が高かった 2,4-D, 4FA および 5,6-IAA の 3 種類のオーキシン様植物成長調整剤をそれぞれ 0.25 mg l^{-1} の濃度で 2 種類組み合わせて添加した。その結果、2,4-D と 4FA を組み合わせた培地では 33.0 ± 4.5 %, 2,4-D と 5,6-IAA を組み合わせた培地では 37.4 ± 5.1 %, 5,6-IAA と 4FA を組み合わせた培地では 35.0 ± 3.2 % の分裂率が得られた。2 種類のオーキシン様植物成長調整剤を組み合わせて添加した L1 培地では 1 種類のオーキシン様植物成長調整剤のみを含む培地よりも分裂率は高く、プロトプラストの初期分裂に対する高い有効性が示された。しかしながら、ホシアサガオの培養方法³⁾に準じて 4 週間毎に培地を交換する方法では、その後の細胞分裂が継続されずにコロニーの形成には至らなかった。

そこで、1 週間毎に 2 ml ずつ新鮮な培地を添加していくベニベンケイ (*Kalanchoe blossfeldiana*) の葉肉プロトプラスト

Fig. 2 Effect of auxin-like plant hormones on protoplast division in mesophyll protoplasts of *Ipomoea purpurea* Q1123. All media contained 0.5 mg l^{-1} auxin-like plant hormones and 1 mg l^{-1} kinetin. The bars represent a mean of 4 replicates $\pm$ SD. 2,4-D, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; dicamba, 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid; 4FA, 4-fluorophenoxyacetic acid; 5,6-IAA, 5,6-dichloro-3-indoleacetic acid; IBA, indole-3-butyric acid; NAA, 1-naphthylacetic acid; picloram, 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid.

Fig. 3 Microcallus formed from mesophyll protoplasts of *Ipomoea purpurea* Q1123 after 20 days of culture in L1 medium supplemented with 2,4-D and kinetin. Bar represents 100 μ m.

Fig. 4 Callus proliferation from mesophyll protoplasts of *Ipomoea purpurea* Q1123 after 90 days of culture on LS medium supplemented with 5,6-IAA and kinetin. Bar represents 1 cm.

Table 2 Effect of plant growth regulators on callus formation from mesophyll protoplasts of *Ipomoea purpurea* Q1123.

Plant hormone (mg l ⁻¹) ¹	No. of cultured protoplasts	Average no. of calli formed (% $\pm$ standard deviation)
2,4-D (0.5)	5.0×10^5	123 (0.03) ²
5,6-IAA (0.5)	5.0×10^5	220.50 (0.04 $\pm$ 0.00)
Dicamba (0.5)	5.0×10^5	248.50 (0.05 $\pm$ 0.01)
2,4-D (0.25)+4FA (0.25)	5.0×10^5	455.50 (0.09 $\pm$ 0.01)
2,4-D (0.25) +5,6-IAA (0.25)	5.0×10^5	482.00 (0.10 $\pm$ 0.01)

*¹ All culture media contained 1 mg l⁻¹ kinetin.

*² One experiment

2,4-D, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; dicamba, 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid; 4FA, 4-fluorophenoxyacetic acid; 5,6-IAA, 5,6-dichloro-3-indoleacetic acid; picloram, 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid.

の培養方法⁹⁾を試した。1週間毎に同組成のL1培地を追加して3週間培養し、その後、L2培地を同様に1週間毎に追加した。オーキシン様植物成長調整剤として2,4-D、5,6-IAA、dicambaをそれぞれ単独で含む、および、2,4-Dと4FAまたは5,6-IAAをとともに含む(2,4-D+4FA、2,4-D+5,6-IAA)計5種類のL1培地中でプロトプラストは分裂を継続し約20日後にはコロニーを形成した(Fig. 3)。さらに、4FAやpicloramを単独で含む培地においても培養30-40日後にコロニーが形成された。しかし、初期の分裂率の高かった5,6-IAAと4FAを併用した培地ではコロニーは形成されなかった。形成されたコロニー数は2種類のオーキシン様植物成長調整剤を組み合わせた培地の方がオーキシン様植物成長調整剤を1種類のみ添加した培地よりも多かった。培養

開始約60日後には各培地中で約1mm幅の大きさの小カルスが形成された。プロトプラストからのカルス形成数は、培養した 5×10^5 個のプロトプラスト当たり、2,4-Dと5,6-IAAを併用した培地では平均482個で最も多かったが、2,4-Dと4FAを併用した培地もほぼ同等の形成数であった(Table 2)。

培養開始から約65日後に、形成された小カルスをカルス増殖培地に移植し約1ヶ月培養したところ、ほとんどの培地上では、大きさが約1-5mm幅のカルスが形成された(Fig. 4)。

3. プロトプラスト由来カルスからの再分化

5mm前後の大きさに増殖したプロトプラスト由来カルスを順次再分化培地に移植したところ、5,6-IAAもしくはdicambaを単独で含む培地で形成されたカルスのみ移植後約5日でカルスの緑化が見られ、約10日後には不定根が再

Fig. 5 Root regeneration from mesophyll protoplast-derived callus of *Ipomoea purpurea* Q1123 on LS medium supplemented with indole-3-acetic acid (IAA) and benzyl adenine (BA). Bar represents 5 mm.

分化し始めた (Fig. 5). 5,6-IAA を含む培地に由来するカルスは、供試した 6 種類の再分化培地全てにおいて高い不定根形成率を示し、特に、 0.2 mg l^{-1} IAA と 2.0 mg l^{-1} BA を添加した再分化培地において移植したカルスの 97.1 % から不定根が再分化した (Table 3). しかし、不定芽や不定胚の再分化は確認されなかった。

ホシアサガオやモミジヒルガオの葉肉プロトプラスト由来カルスでは 2.0 mg l^{-1} BA を添加した培地が不定芽の再分化に有効であることが報告されているが^{3,5)}、本研究では同組成の再分化培地を用いても不定芽や不定胚の再分化は認められなかった。これらの結果から同じ *Ipomoea* 属植物でも種間で再分化能に著しい差異があることが示唆された。

一方、サツマイモのプロトプラスト培養においてマイクロカルス増殖培地に、不定胚誘導の効果があるアブシシン酸 (ABA) を添加することやカルスそのものの乾燥処理によって再分化率が顕著に向上していることから¹⁰⁾、マルバアサガオでも同様の処理を試してみる必要があると考えられる。また、本研究ではプロトプラストの単離材料として葉切片を用いたが、例えばイネなどでは胚性カルスをプロトプラストの単離材料に用いることによって安定した効率の良いプロトプラストからの植物体再生系が確立されていることから^{11,12)}、アサガオの園芸種においてもプロトプラストの単離材料として胚性カルスを試す必要もあると考えられる。

本研究ではこれまで単離と培養の報告がなかったマルバアサガオにおいて効率的な葉肉プロトプラストの単離条件とプロトプラストからのカルス形成および不定根再分化の条件を見出した。本研究の結果は、今後のアサガオおよびその近縁種

のプロトプラスト培養の研究を進めていくうえで、重要な知見を提供したと考えられる。

摘 要

マルバアサガオ (*Ipomoea purpurea*) の葉肉プロトプラストの単離と培養条件を検討した。無菌播種後約 10 日目の実生を供試した。1 % (w/v) Cellulase Onozuka R-10 と 0.3 % (w/v) Pectolyase Y-23 を含む酵素液を用いたところ供試した 3 系統の葉身からの平均プロトプラスト収量は葉片 1 g 新鮮重当たり $6.3 \times 10^6 - 9.2 \times 10^6$ 個であった。単離した葉肉プロトプラストの密度を 1.0×10^5 個 ml^{-1} に調整した後改変 LS 液体培地中で培養したところ、2-3 日後には第一細胞分裂が開始された。2,4-D と kinetin を含む培地で約 26 % のプロトプラストが分裂した。その後、コロニーや小カルスが形成された。プロトプラスト由来カルスを再分化培地に移植したところ、不定根が再分化した。

引用文献

- 1) Murata T, Hoshino K, Miyaji Y. Callus formation and plant regeneration from petiole protoplast of sweet potato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. Japan J. Breed. 37: 291-298. 1987.
- 2) Sihachakr D, Ducreux G. Plant regeneration from protoplast culture of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.). Plant Cell Rep. 6: 326-328. 1987.
- 3) Liu QC, Kokubu T, Sato M. Plant regeneration from *Ipomoea triloba* L. protoplasts. Japan J. Breed. 41: 103-108. 1991.
- 4) Belarmino MM, Abe T, Sasahara T. Plant regeneration from stem and petiole protoplasts of sweet potato (*Ipomoea batatas*) and its wild relative, *I. lacunosa*. Plant Cell, Tiss. and Organ Cult. 37: 145-150. 1994.
- 5) Guo JM, Liu QC, Zhai H, Wang YP. Regeneration of plants from *Ipomoea cairica* L. protoplasts and production of somatic hybrids between *I. cairica* L. and sweet potato, *I. batatas* (L.) Lam. Plant Cell, Tiss. and Organ Cult. 87: 321-327. 2006.
- 6) 塩谷侑子, 大谷基泰. ヨウサイカルスからのプロトプラストの単離と培養. 北陸作物学会報. 52: 17-20. 2017.
- 7) Linsmaier EM, Skoog F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 18: 100-127. 1965.
- 8) Negrutiu I, Shillito R, Potrykus I, Biasini G, Sala F. Hybrid genes in the analysis of transformation conditions. I. Setting up a simple method for direct gene transfer in plant protoplasts. Plant Mol. Biol. 8: 363-373. 1987.

Table 3 Effect of plant hormones on adventitious root formation from mesophyll protoplast-derived callus of *Ipomoea purpurea* Q1123.

Protoplast culture media ^{*1} (mg l ⁻¹)	Regeneration media (mg l ⁻¹)	Total no. of calli transferred	Total no. of calli with regenerated roots (%)
2,4-D (0.5)	BA (2.0)	21	0
	ZEA (2.0)	23	0
	TDZ (2.0)	19	0
	IAA (0.2), BA (2.0)	18	0
	IAA (0.2), ZEA (2.0)	20	0
	IAA (0.2), TDZ (2.0)	22	0
5,6-IAA (0.5)	BA (2.0)	68	52 (76.5)
	ZEA (2.0)	68	47 (69.1)
	TDZ (2.0)	49	17 (34.7)
	IAA (0.2), BA (2.0)	70	68 (97.1)
	IAA (0.2), ZEA (2.0)	70	56 (80.0)
	IAA (0.2), TDZ (2.0)	67	22 (32.8)
dicamba (0.5)	BA (2.0)	73	21 (28.8)
	ZEA (2.0)	72	23 (31.9)
	TDZ (2.0)	64	5 (7.8)
	IAA (0.2), BA (2.0)	86	13 (15.1)
	IAA (0.2), ZEA (2.0)	73	11 (15.1)
	IAA (0.2), TDZ (2.0)	71	6 (8.5)
2,4-D (0.25) + 4FA (0.25)	BA (2.0)	87	0
	ZEA (2.0)	79	0
	TDZ (2.0)	79	0
	IAA (0.2), BA (2.0)	74	0
	IAA (0.2), ZEA (2.0)	88	0
	IAA (0.2), TDZ (2.0)	78	0
2,4-D (0.25) + 5,6-IAA (0.25)	BA (2.0)	91	0
	ZEA (2.0)	90	0
	TDZ (2.0)	85	0
	IAA (0.2), BA (2.0)	79	0
	IAA (0.2), ZEA (2.0)	97	0
	IAA (0.2), TDZ (2.0)	84	0

^{*1} All media contained 1 mg l⁻¹ kinetin.

BA, benzyl adenine; 2,4-D, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; dicamba, 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid; 4FA, 4-fluorophenoxyacetic acid; IAA, indole-3-acetic acid; 5,6-IAA, 5,6-dichloro-3-indoleacetic acid; IBA, indole-3-butyric acid; NAA, 1-naphthylacetic acid; picloram, 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid; TDZ, thidiazuron; ZEA, zeatin.

- 9) Castelblanque L, Sogo B. Efficient plant regeneration from protoplasts of *Kalanchoe blossfeldiana* via organogenesis. Plant Cell, Tiss. and Organ Cult. 100: 107–112. 2010.
- 10) Murata T, Fukuoka H, Kishimoto M. Plant regeneration from mesophyll and cell suspension protoplasts of sweet potato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. Breeding Sci. 44: 35–40. 1994.
- 11) Fujimura T, Sakurai M, Akagi H, Negishi T, Hirose A. Regeneration of rice plants from protoplasts. Plant Tiss. Cult. Lett. 2: 74–75. 1985.
- 12) Kyoizuka J, Hayashi Y, Shimamoto K. High frequency plant regeneration from rice protoplasts by novel nurse culture methods. Mol. Gen. Genet. 206: 408–413. 1987.