

ヒロシマナの花茎プロトプラストからの植物体再生

長久 逸・井本 征史

キーワード：ヒロシマナ，花茎，プロトプラスト，植物体再生，*Brassica campestris*

ヒロシマナ (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis* cv. 'Hiroshimana') は不結球ハクサイ類に分類され、広島県特産のツケナである。形態的特徴としては、開張性で葉が大きく、葉の周辺に欠刻はなく平滑で、葉色は濃緑色を呈し、葉の中肋は幅広く鮮緑色であり、他の品種と区別される。近年、産地である広島市安佐南区は都市化が進み、排水不良の圃場が多く、連作等から根こぶ病が多く発生するようになった。また、ヒロシマナの栽培は冬期に集中していたが、需要の増加により周年供給が求められ、夏期の栽培が行なわれるようになってきた。しかし、夏期の栽培では、ヒロシマナは高温に弱く、軟腐病等により、株を大きく育てることができない。そのため、根こぶ病や軟腐病の抵抗性品種の育成が望まれている。

作物の育種において、細胞融合は、遠縁の耐病性等の有用遺伝子の導入及び細胞質雑種による細胞質雄性不稔系統の育成に有効な手法である。細胞融合による育種素材の作出のためには、対象となる作物のプロトプラスト培養系を確立する必要がある。ヒロシマナの属する *B. campestris* では、プロトプラストからの植物体再生の報告は少なく、安定した再分化系が確立されていない^{7,11,13}。また、プロトプラストを単離する組織として、葉^{7,11,16,18}、子葉⁹および胚軸^{9,13}が用いられている。プロトプラストを単離する組織に関して、Klimaszewska ら⁸はナタネ (*B. napus*) において、Bonfils ら²はカラシナ (*B. juncea*) において、茎の表層の切片から活性の高いプロトプラストを効率的に単離し、プロトプラストからの植物体再生を報告している。しかし、*B. campestris* では、茎の切片由来のプロトプラスト培養についての報告はない。

本研究では、ヒロシマナのプロトプラスト培養系の確立を目的に、花茎の切片からプロトプラストを単離し、培養条件を検討した結果、プロトプラストから完全な植

物体が再生したので報告する。

材料および方法

1. プロトプラストの単離と精製

材料は、品種「広島菜」（井谷種苗）及び広島県立農業技術センターで保存している木原系、田平系を用いた。ガラス室内で栽培し、抽苔して開花し始めた株の花茎上部を70%エタノールに数秒間、次亜塩素酸ナトリウム溶液（塩素濃度1%，Tween 20数滴添加）に15分間浸漬して表面殺菌を行ない、その後滅菌水で3回洗浄した。鋭利なピンセットで花茎の表層を含む薄い切片を剥ぎ取り、前処理を行なった。前処理法は、寺田ら¹⁷の方法に準じ、濃度を1/4とした Nitch and Nitch 1967¹²の培地（NN-67培地）の無機塩と、NN67培地のビタミン類に、0.4M ショ糖を加え、植物ホルモンとして0.5mg/ℓ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 0.5mg/ℓ naphthaleneacetic acid (NAA), 1.0mg/ℓ 6-benzylaminopurine (BA) を含む前処理液中に、花茎の薄い切片を浸漬し、暗黒下で、10℃に14～16時間保って行なった。

その後、前処理液に2%セルラーゼ オノズカ R-10、1%マセロザイム R-10又は0.3～0.5%セルラーゼ オノズカ RS、0.1%ペクトリアーゼ Y-23を添加した酵素液に浸漬し、28℃の暗黒下で、巡回振盪（30回/分）を5時間～5時間30分間行ない、プロトプラストを単離した。プロトプラスト懸濁液は、50μmのナイロンメッシュでろ過後、遠心管に分注し、約1ml W5液（Menczel and Wolfe 1984⁹）を上層液、800回/分で5分間遠心した。層の境界面に集まったプロトプラストを回収し、W5液を加え、750回/分で3分間遠心して洗浄する操作を2回繰り返して、プロトプラストを精製した。

2. プロトプラストの培養

精製したプロトプラストは、Gamborg らりの培地 (B₅ 培地) の無機塩とビタミン類に、1%ショ糖、0.4Mマンニトール、0.4%アガロース (シグマ社製、タイプVII) を加えた培地に、 $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ 個/㎖の密度で包埋し、agarose bead-type 法¹⁵⁾ (アガロース・ビーズ法) で培養した。培養7~10日後に、プロトプラストを包埋したアガロースを3~4mm大に碎き、アガロースを除いた同組成の液体培地を入れたシャーレに移して培養した。その後、マンニトールの濃度を0.4Mから0.3M、0.2Mに変更した液体培地を順次加え、浸透圧、培養密度を低下させて、コロニーの生育を促した。プロトプラスト培養培地に添加する植物ホルモンについては、0.5mg/ℓ 2, 4-D + 0.5mg/ℓ NAA + 0.5mg/ℓ BA 区及び1.0mg/ℓ 2, 4-D + 0.1mg/ℓ NAA + 0.5mg/ℓ BA 区の2区について検討した。培養は、25℃、初期の2週間は暗黒下、その後は1,000 lux、10時間照明下で行なった。

培養30日後に、形成された0.5~1mm大のコロニーを、Murashige and Skoog¹⁶⁾ の培地 (MS 培地) の無機塩と NN67 培地のビタミン類に、1%ショ糖、0.2Mマンニトール、0.25%アガロースを加えたカルス培養培地に移植し、カルスの生育を促した。カルス培養培地に添加する植物ホルモンについては、0.1mg/ℓ 2, 4-D + 1.0mg/ℓ BA 区及び1.0mg/ℓ 2, 4-D + 0.3mg/ℓ kinetin (KIN) 区の2区について検討した。

3. 植物体再生

プロトプラスト由来のカルスからの苗条の再分化は、2~4mm大に生育したカルスを、MS 培地の無機塩と NN67 培地のビタミン類に、0.75%アガロースを加えた培地 (MS-NN 培地) を基本とした2種類の再分化培地に移植して行なった。再分化培地は、MS-NN + 0.2Mマンニトール + 0.5%ショ糖 + 2.0mg/ℓ ゼアチン + 2.0mg/ℓ KIN + 0.1mg/ℓ IAA 区 (I)、及び MS-NN + 1%ショ糖 + 1.0mg/ℓ ゼアチン区 (II) の2区について検討した。

また、花茎プロトプラストからの苗条再分化の系統間差を検討する試験は、次のとおりに行なった。ヒロシマナの2系統及び品種「広島菜」のプロトプラストから再生した植物体4株の花茎よりプロトプラストを単離し、0.5mg/ℓ 2, 4-D + 0.5mg/ℓ NAA + 0.5mg/ℓ BA を添加したプロトプラスト培養培地で培養した後、0.1mg/ℓ 2, 4-D + 1.0mg/ℓ BA を添加したカルス培養培地に移植して形成されたカルスを、再分化培地に移植した。再分化培地は、MS-NN + 0.2Mマンニトール + 0.5%ショ糖 + 1.0mg/ℓ ゼアチン、又は MS-NN + 0.2Mマンニトール + 1%ショ糖 + 2.0mg/ℓ ゼアチン + 0.1mg/ℓ IAA の2種類

の培地を用いた。

再生した苗条は、植物ホルモンを含まず、0.8%寒天を添加した B₅ 培地に移植して、苗条の伸長及び発根を促した。苗条の再分化及び発根は、25℃、2,000 lux、10時間照明下で行なった。発根した植物体は、パーミキュライトを入れたプラスチック製鉢に移植して順化後、鉢上げた。

実験結果

1. プロトプラストの単離と培養

ヒロシマナの花茎の表層の薄い切片を供試し、前処理後、2%セルラーゼ・オノヅカ R-10、1%マセロザイム R-10 を含む酵素液で、28℃、5時間30分間処理することにより、プロトプラストの収量は、花茎の切片1g 当たり 7×10^6 個であった。プロトプラストの大きさは30~60 μm で、葉緑体の数及び細胞質の密度に、プロトプラスト間で差異が認められた (Fig. 1A)。

プロトプラストを0.5mg/ℓ 2, 4-D + 0.5mg/ℓ NAA + 0.5mg/ℓ BA 区で培養した場合、プロトプラストの第1細胞分裂 (Fig. 1B) は、培養24時間後に認められた。48時間後の細胞分裂率 (分裂細胞数/培養プロトプラスト数) は32%で、一部には第2細胞分裂も観察された。培養7日後のプロトプラストの細胞分裂率は40%であった。培養9日後には棒状の細胞からなる小コロニーが認められた (Fig. 1C)。

アガロースに包埋したままの状態では、細胞の周辺に褐変化物質が蓄積して、コロニーの生育が阻害されたが、アガロースブロックを液体培地に移植して培養することにより、コロニーの生育が促進された。培養17日後には300~500 μm のコロニー (Fig. 1D) となり、コロニー形成率 (コロニー数/培養プロトプラスト数) は5%であった。1.0mg/ℓ 2, 4-D + 0.1mg/ℓ NAA + 0.5mg/ℓ BA 区においてもほぼ同様のコロニー形成がみられ、植物ホルモン濃度の異なる2区のプロトプラスト培養培地間において、プロトプラストの細胞分裂、コロニー形成には、明らかな差は認められなかった。

培養30日後に、0.5~1mmに生育したコロニー (Fig. 1E) を2種類のカルス培養培地に移植した。1.0mg/ℓ 2, 4-D + 0.3mg/ℓ KIN 区では、移植後、褐変するコロニーが多く、0.1mg/ℓ 2, 4-D + 1.0mg/ℓ BA 区の方が、カルスの形成が良好であった。移植時のコロニーの色は、乳白色であったが、カルス培養培地に移植して3~4週間後には、黄緑色で表面がざらざらした感じの2~3mm大のカルスに生育した (Fig. 1F)。カルス培養培地 (0.1mg/

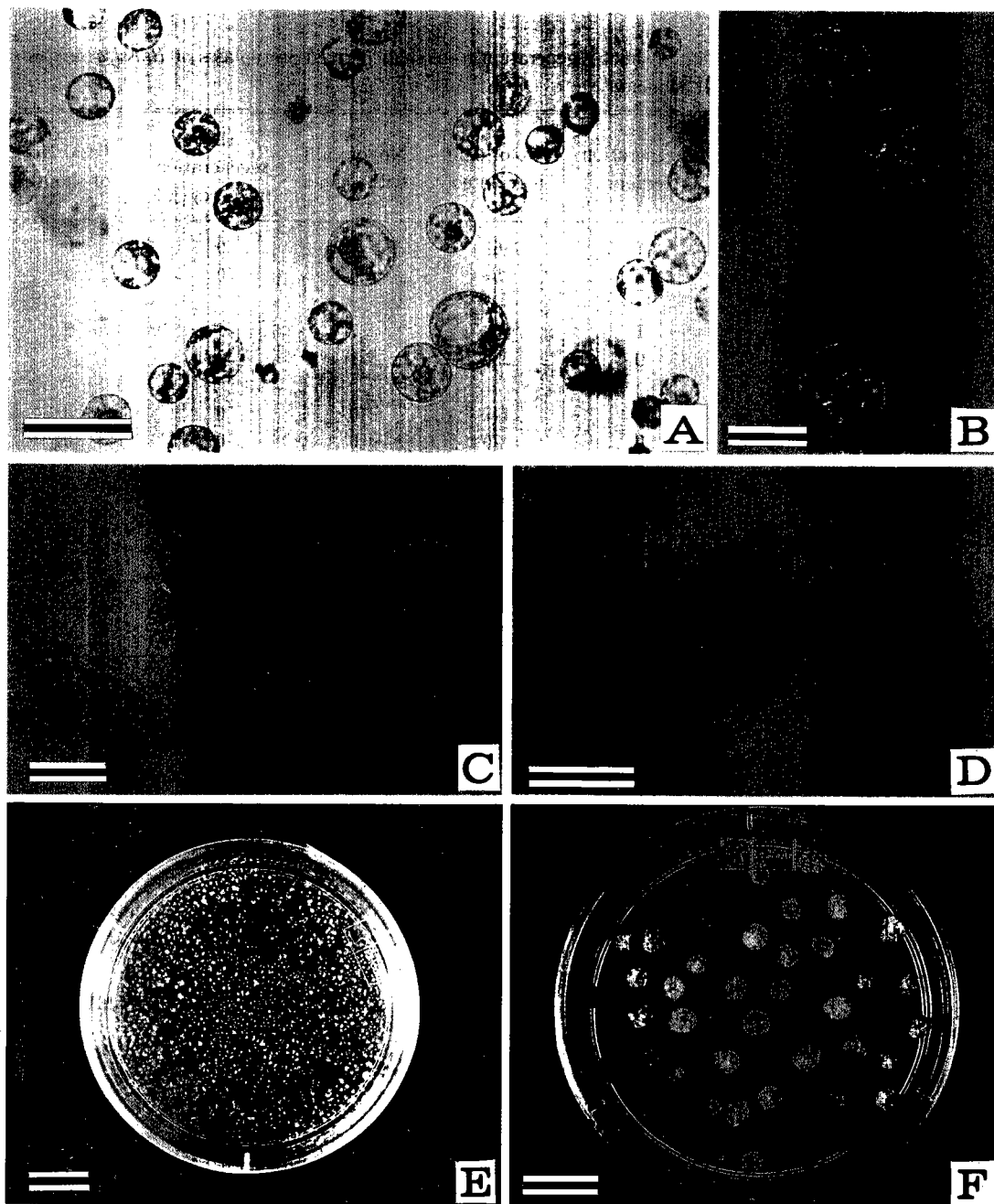


Fig. 1 Callus development from stem-derived protoplasts of *Brassica campestris* cv. 'Hiroshimana'.

A : Freshly isolated protoplasts from stem segments. B : First cell division after 48 hr of culture. C : Small cell colonies after 9 days of culture. D : Cell colony after 15 days of culture. E : Macroscopic colonies after 4 weeks of culture. F : Calli after 8 weeks of culture. Bar=100 μ m (A, C, D), 50 μ m (B), 1 cm (E, F).

Table 1 Effect of various media on shoot regeneration from stem-derived protoplasts of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* cv. 'Hiroshimana'.

Protoplast culture medium ^a (mg/ℓ)	Callus culture medium ^b (mg/ℓ)	Regeneration medium ^c	No. of calli inoculated	No. of calli with shoots	Shoot regeneration frequency (%)	Total No. of shoots
	2,4-D 1.0	I	469	0	0	0
2,4-D 0.5	KIN 0.3	II	154	0	0	0
NAA 0.5						
BA 0.5	2,4-D 0.1	I	630	7	1.1	8
	BA 1.0	II	252	1	0.4	1
	2,4-D 1.0	I	147	0	0	0
2,4-D 1.0	KIN 0.3	II	70	0	0	0
NAA 0.1						
BA 0.5	2,4-D 0.1	I	350	0	0	0
	BA 1.0	II	252	0	0	0

a Protoplast culture medium : B₅ medium supplemented with 0.4 M mannitol and 1% sucrose.

b Callus culture medium : MS basal salts and NN 67 organics supplemented with 0.2 M mannitol, 1% sucrose and 0.25% agarose.

c Regeneration medium I : MS basal salts and NN 67 organics supplemented with 2.0mg/ℓ zeatin, 2.0mg/ℓ kinetin, 0.1mg/ℓ IAA, 0.2 M mannitol, 1% sucrose and 0.75% agarose.

Regeneration medium II : MS basal salts and NN 67 organics supplemented with 1.0mg/ℓ zeatin, 1% sucrose and 0.75% agarose.

ℓ 2,4-D+1.0mg/ℓ BA 区)に移植して3週間後に, 1.5 mm以上の大きさに生育したカルスの形成率(カルス数/培養プロトプラスト数)は2%であった。

2. 植物体再生

プロトプラストからの苗条の再分化については, 品種'広島菜'の花茎から単離したプロトプラストを2種類のプロトプラスト培養培地で培養し, 2種類のカルス培養培地に移植して得られた2~3mm大のカルスを, 2種類の再分化培地に移植して検討し, その結果を Table 1 に示した。苗条の再分化は, 0.5mg/ℓ 2,4-D+0.5mg/ℓ NAA+0.5mg/ℓ BA を添加したプロトプラスト培養培地でプロトプラストを培養した後, 0.1mg/ℓ 2,4-D+1.0mg/ℓ BA を添加したカルス培養培地でカルスを形成させた場合だけに認められた。630個のカルスを, 再分化培地 I (0.2Mマンニトール+0.5%ショ糖+2.0mg/ℓ ゼアチン+2.0mg/ℓ KIN+0.1mg/ℓ IAA 区)に移植した結果, 7個のカルスから8個の苗条が再分化し, 苗条の再分化率は1.1%であった。252個のカルスを, 再分化培地 II (1%ショ糖+1.0mg/ℓ ゼアチン区)に移植した結果, 1個のカルスから1個の苗条が再分化し, 苗条の再分化率は0.4

%であった。

ヒロシマナの花茎プロトプラストからの苗条再生の系統間差は, ヒロシマナの2系統及び品種'広島菜'の花茎プロトプラストから再生した植物体4株の花茎より, プロトプラストを単離後, 培養して得られたカルスからの苗条再生について検討し, その結果を Table 2 に示した。3430個のカルスを再分化培地に移植した結果, 田平系の4個のカルスから4個の苗条が再分化した。木原系及びプロトプラスト再生植物由来のカルスからは, 苗条の再生は認められなかった。田平系では, 2回の試験において, 2回ともプロトプラストから苗条が再生し, 再分化率は, それぞれ0.2%, 1.2%であった。また, 田平系では, プロトプラスト由来のカルスの形態が他の系統のカルスとは若干異なり, 柔らかく, カルスの表面の凹凸が大きい傾向が認められた。

カルスからの苗条の再分化は, 再分化培地に移植して2~3週間後に認められ, 1カルス当たりの苗条数は, 1~2個であった。カルスからの苗条の再生において, カルスから苗条だけが分化しているもの (Fig. 2A) 及び苗条の分化と共に根毛, 根が分化しているもの (Fig. 2B) が認められた。カルスから再生した苗条の一部には, 葉

Table 2 Shoot regeneration frequency from protoplast-derived calli of different lines.

Line	No. of calli inoculated	No. of calli with shoot	Shoot regeneration frequency (%)	Total No. of shoots
Kihara	504	0	0	0
Denbira	Exp. 1	819	2	0.2
	Exp. 2	168	2	1.2
Regenerated plant No. 1	940	0	0	0
No. 2	152	0	0	0
No. 3	416	0	0	0
No. 4	431	0	0	0

Protoplast culture medium : B₅ medium supplemented with 0.5mg/ℓ 2,4-D, 0.5mg/ℓ NAA, 0.5mg/ℓ BA, 0.4 M mannitol and 1% sucrose.

Callus culture medium : MS basal salts and NN 67 organics supplemented with 0.1mg/ℓ 2,4-D, 1.0mg/ℓ BA, 0.2 M mannitol, 1% sucrose and 0.25% agarose.

Regeneration medium : MS basal salts and NN 67 organics supplemented with 2.0mg/ℓ zeatin, 0.1mg/ℓ IAA, 0.2 M mannitol, 1% sucrose and 0.75% agarose, or with 1.0mg/ℓ zeatin, 0.2 M mannitol, 0.5% sucrose and 0.75% agarose.

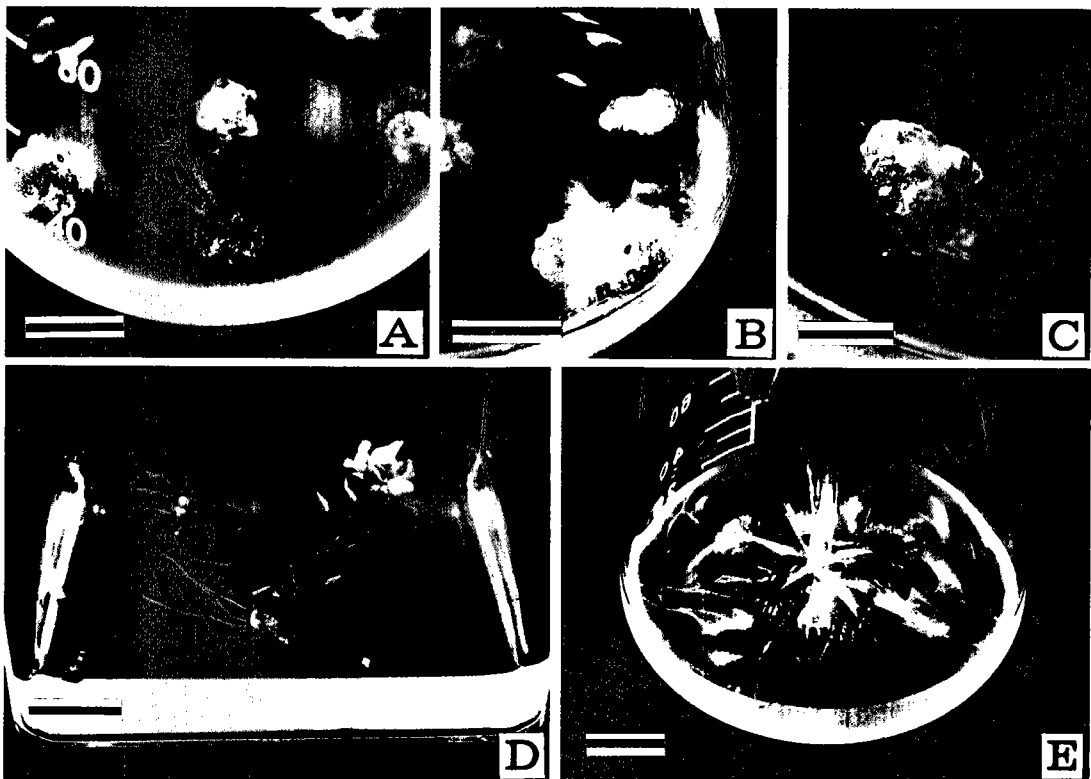


Fig. 2 Shoot and plantlet regeneration from protoplast-derived callus.

A-C : Shoot regeneration from callus after 3 months of culture. A : Shoot developed from compact callus. B : Shoot and roots developed from callus. C : Abnormal shoot developed from callus. D : Flower bud development on B₅ medium without hormone 10 weeks after transfer to the regeneration medium. E : Regenerated plantlet with roots on B₅ medium without hormone. Bar= 1 cm (A, B, D, E), 0.5cm (C).

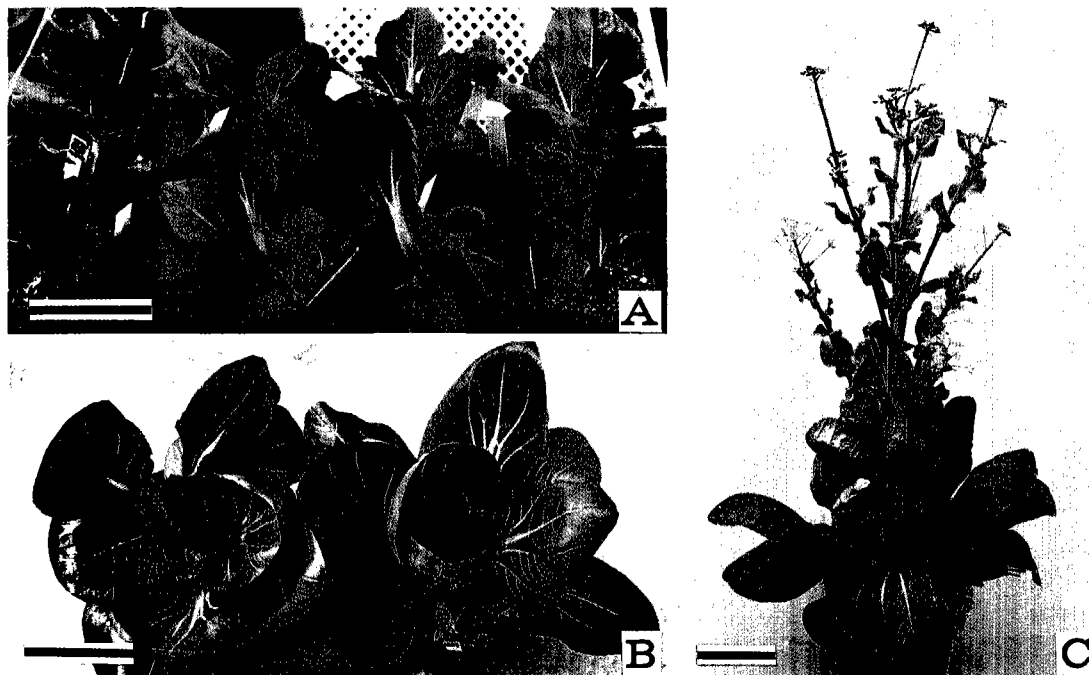


Fig. 3 Regenerated plants from stem-driven protoplasts.

A : Protoplasts-derived plants with pots acclimatized and grown in greenhouse. B : Regenerated plants showing no obvious phenotypic difference from the parental plant mass. C : Regenerated plant showing normal flowering. Bar=10cm.

が変形する等、形態が正常な苗条とは若干異なるものが認められた (Fig. 2C)。

苗条はカルスから切り取って、植物ホルモン無添加の B_5 培地に移植すると、苗条が伸長し、発根して植物体となった。(Fig. 2E)。正常な苗条とは若干異なる形態をしている苗条は、カルスから切り取って植物ホルモン無添加の B_5 培地に移植すると、一部は、直ちに花芽が伸長した (Fig. 2D)。

発根した植物体はパーミキュライトを入れたプラスチック製鉢に移植して順化することにより、容易に順化でき、6個のカルス由来の植物体11個体を鉢上げすることができた (Fig. 3A)。11個体中10個体は、プロトプラストを単離したヒロシマナの集団と同じ外部形態であったが (Fig. 3B)、他の1個体は、葉が若干湾曲した感じになっていた。この1個体は抽苔して開花したが、花弁の萎縮及び葯の退化等の花器の奇形が認められた。形態の変異が認められなかった10個体中9個体は抽苔して開花し、花器は正常であった (Fig. 3C)。開花期が6月であったが、大部分の個体において自殖種子が得られた。

考 察

1. プロトプラストの単離と培養

ヒロシマナの花茎の表層の薄い切片から、効率的に、細胞分裂活性の高いプロトプラストを単離することができた。プロトプラストの収量は 7×10^6 個/g で、Klimaszewska ら⁸⁾の報告しているナタネの花茎プロトプラストの収量 $2 \sim 2.8 \times 10^6$ 個/g に比べて高かった。また、Poleman-Stephenson ら¹³⁾の報告したアブラナ (*B. campestris*) の胚軸プロトプラストの収量は 8×10^5 個/g であり、花茎を用いてプロトプラストを単離する方が、胚軸を用いた場合よりも、収量が非常に高いと考えられた。

ヒロシマナの花茎由来のプロトプラストをアガロース・ビーズ法で培養すると、培養24時間後には細胞分裂を開始し、48時間後の細胞分裂率は32%、7日後の細胞分裂率は40%であった。また、培養17日後には、 $300 \sim 500 \mu\text{m}$ のコロニーとなり、培養した細胞に対するコロニー形成率は5%であった。Glimelius⁵⁾は、ナタネの胚軸由来のプロトプラストでは、培養24時間後には細胞分裂が認められ、48時間後の細胞分裂率は60%、また、アブラナの胚

軸プロトプラストでは、培養5日後の細胞分裂率は34%と報告している。ヒロシマナの花茎由来のプロトプラストは、胚軸由来のプロトプラストと同様に、早期に細胞分裂が起こり、分裂能が高く、生育が速いと考えられた。

Brassica 属の作物のプロトプラスト培養において、褐変物質が生産され、細胞の生育が阻害又は停止することが報告されている¹⁵⁾。ヒロシマナの花茎由来のプロトプラストは、早期に細胞分裂が起こり、細胞の生育が速いため、褐変物質の蓄積よりも早く、棒状の細胞からなるコロニーを形成し、褐変物質の影響を受けにくかった。また、アガロース・ビーズ法で培養したことより、培養初期から液体培地の交換が可能で、培地の交換により褐変物質を除去することができた。そのため、花茎由来のプロトプラストをアガロース・ビーズ法で培養すると、培養したプロトプラストの2%がカルスに生育した。本研究におけるヒロシマナの花茎由来プロトプラストのカルス形成率は、山岸ら¹⁸⁾の報告したハクサイ (*B. campestris*) の葉肉プロトプラストのカルス形成率0.5%、Poleman-Stephenson ら¹³⁾の報告したアブラナ胚軸プロトプラストのカルス形成率0.1%に比べて高かった。

2. 植物体再生

B. campestris のプロトプラストからの苗条再生についての報告は、キャベツ (*B. oleracea*)、ナタネ (*B. napus*) に比べて少なく、苗条再生が難しいとされている^{7,11,13)}。Glimelius⁵⁾、Poleman-Stephenson ら¹³⁾はアブラナの胚軸プロトプラストからの苗条再生、Jourdan ら⁷⁾はアブラナの葉肉プロトプラストの苗条再生、山岸ら¹⁸⁾はハクサイの葉肉プロトプラストからの苗条再生、寺田¹⁶⁾及び西尾ら¹¹⁾はコマツナの葉肉プロトプラストからの苗条再生、Hegazi ら⁶⁾はカブの子葉プロトプラストからの苗条再生を報告している。しかしながら、プロトプラストからの苗条再生の頻度が低い、あるいはプロトプラストからの苗条再生の再現性が悪く、プロトプラストからの安定した再分化系が確立されていない。本研究において、ヒロシマナの花茎由来のプロトプラストから苗条が再分化したが、その再分化率は0.2~1.2%と低率で、苗条の再分化は安定したものではなかった。

Robertson ら¹⁴⁾は、ブロッコリー (*B. oleracea*) において、胚軸切片から再生した植物体及び種子由来の植物体の葉肉プロトプラスト培養について検討した結果、胚軸から再生した植物体由来のプロトプラストは、植物体再生能力が非常に高かったと報告している。本研究において、ヒロシマナのプロトプラストより再生した植物体から花茎プロトプラストを単離して培養し、形成された

カルスからの苗条の再生について検討したが、苗条の再生は認められなかった。今後、再生植物由来のプロトプラストからの苗条再生についてさらに検討を要する。

プロトプラストからの苗条再生には、品種間差異があり、遺伝的に支配されていることが報告されている^{3,7)}。同じ種においても、全く再生しない品種から高頻度に再生する品種があり、品種・系統間で、苗条の再生能力にかなりの差異が認められている。ヒロシマナにおいて、田平系のプロトプラスト由来のカルスの形態は、他の系統のカルスとは若干異なり、また、2回の試験で2回とも低率ながら植物体が再生した。今後、田平系を用いて、プロトプラストからの苗条再生の再現性を検討する。

ヒロシマナの花茎プロトプラスト由来のカルスから再分化した苗条の一部は、正常な苗条とは形態が若干異なり、苗条の生育の段階で直ちに花芽を形成した。苗条が分化した時の形態及び花芽分化を誘導しない温度、日長条件 (25℃, 10時間照明下) で培養していることから、カルスから直接に花芽が分化したと推察された。ヒロシマナの花茎切片を BA と NAA を添加した B₅ 寒地培地で培養すると、切片から花芽が直接に分化することが認められているが (長久, 未発表), 花茎のプロトプラスト由来のカルスにおいて、カルスから直接に花芽分化した現象は興味深い。

ヒロシマナの花茎由来プロトプラストから再生した植物体の1個体において、葉の形態及び花器の奇形が認められた。*B. campestris* ではプロトプラストからの再生植物の変異についての報告はないが、山下ら¹⁹⁾はキャベツ (*B. oleracea*) のプロトプラストから再生した植物体21個体において、7個体は染色体数が倍加した4倍体であったと報告している。また、Robertson ら¹⁴⁾は、ブロッコリーの葉肉プロトプラストから再生した植物体178個体において、色々な外部形態の変異を認めている。ヒロシマナにおいて、プロトプラスト培養を育種に利用していくためには、プロトプラストから再生した植物体の変異について詳しく分析することが必要である。

ヒロシマナの花茎由来のプロトプラストは、細胞分裂活性が高く、アガロース・ビーズ法で培養すると、効率的にカルスを誘導することができた。しかし、カルスからの植物体再生は低率であった。本研究で用いた花茎プロトプラストの培養系により、ヒロシマナの多数の品種・系統及び再生植物体から、効率的に再分化能の高いヒロシマナを探索することができる。再分化能の高いヒロシマナの系統がみつければ、花茎プロトプラストの培養系を用いて、細胞融合及び遺伝子導入技術の開発が可能になる。

摘 要

ヒロシマナの花茎の切片からプロトプラストを単離、培養して、プロトプラストからの植物体再生について検討した。

1. 花茎上部から表層の薄い切片を剥ぎ取り、2%セルラーゼ オノズカ R-10, 1%マセロザイム R-10を含む酵素液で、28℃, 5時間30分処理することにより、7×10⁶個/gの活性の高いプロトプラストを単離することができた。

2. 花茎プロトプラストは、0.4Mマンニトール、1%ショ糖、0.5mg/ℓ 2, 4-D, 0.5mg/ℓ NAA, 0.5mg/ℓ BA, 0.4%アガロースを含むB₅培地に包埋し、アガロース・ビーズ法で培養した。培養24時間後には細胞分裂が認められ、48時間後の分裂率は32%であった。培養17日後には、300~500μmのコロニーとなり、コロニー形成率は5%であった。

3. 花茎プロトプラスト由来のコロニーは、0.1mg/ℓ 2, 4-D, 1.0mg/ℓ BAを添加したカルス形成培地に移植すると、培養したプロトプラストに対して2%の頻度でカルスを形成した。

4. 花茎プロトプラスト由来のカルスは、1.0又は2.0mg/ℓ ゼアチンを添加した再分化培地に移植すると、苗条を再生し、苗条の再分化率は0.2~1.2%であった。苗条は植物ホルモン無添加のB₅培地に移植後、発根して植物体となった。

5. 再生植物体の11個体中10個体は、ヒロシマナと同じ外部形態で、開花して自殖種子が得られたが、他の1個体は葉及び花器に奇形が認められた。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、中国農業試験場の太川安信室長及び京都産業大学の山岸博助教授から有益な指導と助言を頂いた。ここに感謝の意を表する。

引 用 文 献

1) BARSBY, T. L., S. A. YARROW and J. F. SHEPARD : 1986. A rapid and efficient alternative procedure for the regeneration of plants from hypocotyl protoplasts of *Brassica napus*. *Plant Cell Reports* **5** : 101-103.
2) BONFILS, A. -C., A. SPROULE, J. A. WEBB and W. A. KELLER : 1992. Plant regeneration from stem cortex explant and protoplast cultures of *Brassica juncea*.

Plant Cell Reports **11** : 614-617.

3) DHIR, S. K., S. DHIR and J. M. WIDHOLM : 1992. Regeneration of fertile plants from protoplasts of soybean: Genotypic differences in culture response. *Plant Cell Reports* **11** : 285-289.

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) GLIMELIUS, K. : 1984. High growth rate and regeneration capacity of hypocotyl protoplasts in some Brassicaceae. *Physiol. Plant.* **61** : 38-44.

6) HEGAZI, H. H. and S. MATSUBARA : 1992. Callus formation and plant regeneration from protoplast derived from cotyledons and hypocotyls of radish and other cruciferous plants. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* **61** : 63-68.

7) JOURDAN, P. S. and E. D. EARLE : 1989. Genotypic variability in the frequency of plant regeneration from leaf protoplasts of four *Brassica* spp. and *Raphanus sativus*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **114** : 343-349.

8) KLIMASZEWSKA, K. and W. A. KELLER : 1987. Plant regeneration from cortex protoplasts of *Brassica napus*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **8** : 225-233.

9) MENCZEL, L. and K. WOLFE : 1984. High frequency of fusion induced in freely suspended protoplast mixtures by polyethylene glycol and dimethylsulfoxide at high pH. *Plant Cell Reports* **3** : 196-198.

10) MURASHIGE, T. and F. SKOOG : 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15** : 473-497.

11) 西尾 剛・坂田好輝・山岸 博・田部井豊・佐藤隆徳・高柳謙治 : 1989. 各種野菜におけるプロトプラスト培養技術の開発と改良. 野菜・茶業試験場研究報告 **A3** : 67-96.

12) NITSCH, C. and J. P. NITSCH : 1967. The induction of flowering in vitro stem segment of *Plumbago indica* L. I. The production of vegetative buds. *Planta* **72** : 355-370.

13) POLEMAN-STEPHENSON, J. C., T. WALTERS and E. D. EARLE : 1990. Callus formation and plant regeneration from protoplasts of rapid-cycling *Brassica campestris* L. *Cruciferae Newsletter* **14/15** : 106-107.

14) ROBERTSON, D. and E. D. EARLE : 1986. Plant

regeneration from leaf protoplasts of *Brassica oleracea* var. *italica* cv. Green Comet broccoli. Plant Cell Reports 5 : 61-64.

15) SHILLITO, R. D., I. PASZKOWSKI and I. POTLYKUS : 1983. Agarose plating and bead type culture technique enable and stimulate development of protoplast-derived colonies in a number of plant species. Plant Cell Reports 2 : 244-247.

16) 寺田理枝：1987. *Brassica campestris* のプロトプラスト培養：植物材料の前処理効果. 植物組織培養 4 : 43-44.

17) TERADA, R., Y. YAMASHITA, S. NISHIBAYASHI and

K. SHIMAMOTO : 1987. Somatic hybrids between *Brassica oleracea* and *B. campestris* : selection by the use of iodoacetamide inactivation and regeneration ability. Theor. Appl. Genet. 73 : 379-384.

18) 山岸 博・西尾 剛・高柳謙治：1988. ハクサイ葉肉プロトプラストからの植物体再分化. 園学雑 57 : 200-205.

19) YAMASHITA, Y. and K. SHIMAMOTO : 1989. Regeneration of plants from cabbage protoplast. Biotechnology in agriculture and forestry vol. 8. Plant protoplasts and genetic engineering I. (ed. by Y. P. S. Bajaj) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg : 193-205.

Plant Regeneration from Stem-derived Protoplasts of
Brassica campestris ssp. *pekinensis* cv. 'Hiroshimana'

Suguru CHOKYU and Masashi IMOTO

Summary

Protoplasts were isolated from cell layer strips, which were excised from terminal stem of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* cv. 'Hiroshimana' at the early flowering stage, with incubating in enzyme solution containing 2 % Cellulase 'Onozuka' R-10 and 1% Macerozyme R-10 for 5.5 hr at 28°C.

Protoplasts were obtained at the rate of 7×10^6 per one gram of stem segments and were cultured in B₅ medium containing 0.4M mannitol, 1% sucrose, 0.5mg/ℓ 2, 4-D, 0.5mg/ℓ NAA, 0.5mg/ℓ BA and 0.4% agarose by agarose-bead type culture.

The first cell divisions were observed after 24 hr and 32% of cultured protoplasts had divided after 48hr. 5% of cultured protoplasts formed cell colonies of 300-500 μm in size after 17 days of culture. Macroscopic colonies of 0.5-1.0mm in size were obtained after 30 days, which were transferred to proliferation medium supplemented with 0.1mg/ℓ 2, 4-D and 1.0mg/ℓ BA, developed into calli with 2% of cultured protoplasts.

0.2-1.2% of calli regenerated shoots on regeneration medium containing 1.0 or 2.0mg/ℓ zeatin. Shoots produced roots on B₅ medium without hormone and grew into plantlets.

Ten plants out of 11 regenerated plants showed no obvious phenotypic variation and most of normal plants set seeds after selfing, the rest one plant showed morphological abnormality in leaf and flower.

Key words : *Brassica campestris*, protoplast, stem, plant regeneration, Hiroshimana