

## 不定胚培養系によるワサビのクローン増殖

春木 和久\*・山田 員人\*

Clonal Propagation of Japanese Horseradish  
(*Wasabia japonica* MATSUMURA) by Somatic Embryogenesis

Kazuhisa HARUKI and Kazuto YAMADA

## 目 次

I. 緒 言 .....	19	VI. 不定胚からの再生個体の生育状況 .....	33
II. 種子からの不定胚形成 .....	20	VII. 考 察 .....	35
III. 薬からの不定胚形成 .....	23	VIII. 摘 要 .....	37
IV. 二次胚形成を利用した不定胚の増殖 .....	27	引用文献 .....	38
V. 不定胚からの植物体再生 .....	31	Summary .....	40

## I. 緒 言

ワサビ (*Wasabia japonica* MATSUMURA) は同属のユリワサビ (*Wasabia tenuis* MATSUMURA) とともにアブラナ科に属した日本原産の植物で<sup>21)</sup>、その根茎はすりおろして寿司や刺身などの香辛料として利用されている。島根県では古くからワサビの栽培が行われており、特に石見地方の山間部で栽培が盛んである。

ワサビの品種は、遺伝的にヘテロなものが多く、その増殖はおもに栄養体によってなされている。そのため増殖率が低く、育成された新品種が普及するまでに長期間を要するのが問題であり、当场で育成された‘さんべ’、‘さぶみ’、‘いわみ’<sup>43)</sup>が今なお普及していない原因の一つとなっている。また、‘島根3号’は実生繁殖可能な品種とされているが<sup>4)</sup>、固定されたものではないため実生栽培では個体間にわずかながら変異がみられ、実生栽培を繰り返しているうちに、その形質が原種と変わってきているものも多くみられている。

栄養体繁殖性植物の増殖法として、最近では組織培

養技術が利用されはじめ、多くの作物で大量増殖が可能になってきている<sup>9,32,37)</sup>。ワサビでも茎頂あるいは花茎の腋芽を培養して発生したシュートを試験管内で分割増殖することによる大量増殖法が開発され、1か月間に2~3倍の率で増殖が可能となっている<sup>11,12,13,27,36)</sup>。筆者らも、茎頂培養による大量増殖法を開発したことを報告しており<sup>45)</sup>、現在では、この技術を用いて島根県美濃郡四見町に増殖施設が建設され、県内にワサビの優良系統の無病苗を供給している。

しかし、この方法では、増殖する際に多くの労力を必要とし、苗の生産コストが高くなるのが問題となっている。最近、より効率的な増殖法として不定胚を利用した方法が検討され、アスパラガス、メロンなどでの成功例が報告されている<sup>33,37)</sup>。これは、植物体の組織切片から誘導したカルスから不定胚を形成させ、更に、植物体に再生させようとするものである。この方法では、増殖は培養の容易なカルスの状態でいい、植物体への再生は、種子内の胚と同等の能力をもっていると考えられる不定胚を経由して行うため、増殖及び再生時ともに労力の大幅な節減が期待できる。そ

ここで、ワサビについて不定胚の形成法と増殖法、不定胚からの植物体再生法について検討したので、その結果を報告する。

なお、本研究は、農林水産省農林水産技術会議の地域バイオテクノロジー研究開発促進事業によって行ったものであり、関係機関に深く感謝の意を表する。

## II. 種子からの不定胚形成

不定胚の誘導には現在のところ2種類の方法が利用されている。その一つは植物体の一部から誘導したカルスに不定胚を形成させる方法であり、他の一つは植物組織切片の表面に直接不定胚を形成させる方法である<sup>33)</sup>。前者は、ニンジンをはじめとして多くの作物で報告されている。ワサビについても、筆者らは、種子の子葉切片から形成させたカルスに不定胚が誘導されることを報告<sup>10)</sup>したが、再現性が低く、同じ方法での実験の繰り返しにより、わずか3例で成功しているにすぎない。しかし、ホルモンフリーの培地を用いて不定胚から植物体を再生する過程で、その子葉の一部に二次的に不定胚が形成されることを認めている<sup>10)</sup>。このように、不定胚の表面に二次的に不定胚が形成される現象を以下二次胚形成と略称することにする。

ワサビにおいて不定胚の子葉の表面に二次胚形成がみられることは、ワサビの不定胚表面は不定胚形成能が極めて高いことを示唆している。体細胞から形成された不定胚と、卵細胞から形成された胚とが同等の機能を持っているとすれば、二次胚形成のみられる不定胚と同じステージの未熟胚をさやから摘出して培養した場合にもその表面に不定胚が形成されることが予想される。そこで、種子あるいは未熟胚を用いて組織表面からの不定胚誘導を検討した。

### 1. 実験材料及び方法

#### 1) 種子のステージと不定胚形成

培養材料には、ワサビ'島根3号'の完熟種子の子葉、未熟種子の子葉及び未熟胚を利用した。完熟種子は、採取後等量の湿った砂と混合して約10か月間10°Cで貯蔵したものを用いた。また、未熟種子については、開花後約40日間経過したもので子葉が生育して完熟種子とほぼ同様な大きさになったもの、未熟種子については長さ約6mmの魚雷型のものを用いた。

材料の滅菌は、さやごと70%エタノールに30秒間浸漬後、有効塩素1%の次亜塩素酸ナトリウム水溶液に10分間浸漬することによって行った。滅菌後、滅菌水

で3回洗浄し、さやの中から無菌的に培養材料を取出して培地に置床した。完熟種子と未熟種子の子葉を供試する際には生長点を含まないように注意して切り取り、向軸側を培地につけて置床した。

培地は、硝酸アンモニウムと硝酸カリウムの濃度を1/2、しょ糖濃度を20g/lに変更したMS培地<sup>29)</sup>を基本培地とし(以後ワサビ用改変MS培地と略称)、植物ホルモンを添加した後、pH5.8に調整してゼランガム0.2%で固化したものを用いた。植物ホルモンは、6-ベンジルアミノプリン(BA)、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)、インドール-3-酢酸(IAA)を用い、第1表に示した濃度で組み合わせて添加した。培養は9cmプラスチックシャーレを各区3枚用い、シャーレに10個ずつ材料を置床した。培養条件は20°C暗黒とし、培養60日後に調査を行った。以下の実験では特記しない限り、滅菌及び培養方法は同一とした。

#### 2) 培地の種類と不定胚形成

未熟種子の子葉を供試材料とし、培地はMS、ワサビ用改変MS、B5<sup>44)</sup>の固形培地(しょ糖濃度20g/l、ゼランガム0.2%で固化)を用い、それぞれBA0.1mg/lの添加区及び無添加区を設けた(第1図)。供試材料は9cmプラスチックシャーレに10個ずつ各区12枚に置床した。不定胚形成程度の評価は3段階で行い、外植体にわずかに不定胚が形成される場合は±、外植体を覆う程度に形成された場合は+、外植体全体を覆い、しかもその部分から外に広がるように形成された場合を++とした。

#### 3) BA及び2,4-Dの濃度と不定胚形成

培養は、ワサビ用改変MS培地にBA(0, 0.1, 0.5 mg/l)及び2,4-D(0, 0.5, 1.0mg/l)を第2図に示すように組み合わせて添加し、各区8枚のシャーレに未熟種子の子葉を10枚ずつ置床して行った。

#### 4) 植物体再生と二次的に形成された不定胚の培養

各実験で形成された不定胚は、培地を入れた9cmプラスチックシャーレに移植し、植物体再生を行った。培地はゼランガム0.2%で固化したホルモンフリーのワサビ用改変MS培地を用い、シャーレ1枚あたり5~10個を置床した。培養条件は20°C、3000lx、12時間日長とした。

また、植物体再生過程で二次的に形成された不定胚は、ホルモンフリーのワサビ用改変MS培地50mlを入れた100ml三角フラスコで振とう培養(100rpm回転式)を行った。

## 2. 実験結果

種子のステージが不定胚形成に及ぼす影響について検討し、その結果を第1表に示した。

### 1) 種子のステージと不定胚形成

第1表 種子のステージと不定胚形成

供試部位	添加ホルモン			カルス形生 %	不定胚形 成 %	発芽 (伸長) %	子葉 拡大 %	根発生 %
	BA mg/l	2,4-D mg/l	IAA mg/l					
完熟種子 子葉	0	1.0	0	100	0	0	0	0
	0.1	1.0	0	100	0	0	0	0
	0	0	1.0	0	0	0	0	80
	0.1	0	1.0	0	0	0	0	100
		ホルモンフリー			0	0	0	0
未熟種子 子葉	0	1.0	0	83	0	0	0	0
	0.1	1.0	0	100	0	0	0	0
	0	0	1.0	50	27	0	23	0
	0.1	0	1.0	67	0	0	33	0
		ホルモンフリー			0	40	0	33
未熟胚	0	1.0	0	0	7	0	0	0
	0.1	1.0	0	100	0	0	0	0
	0	0	1.0	0	17	70	0	0
	0.1	0	1.0	0	47	100	0	0
		ホルモンフリー			0	37	37	0

注) 供試数は各区30個

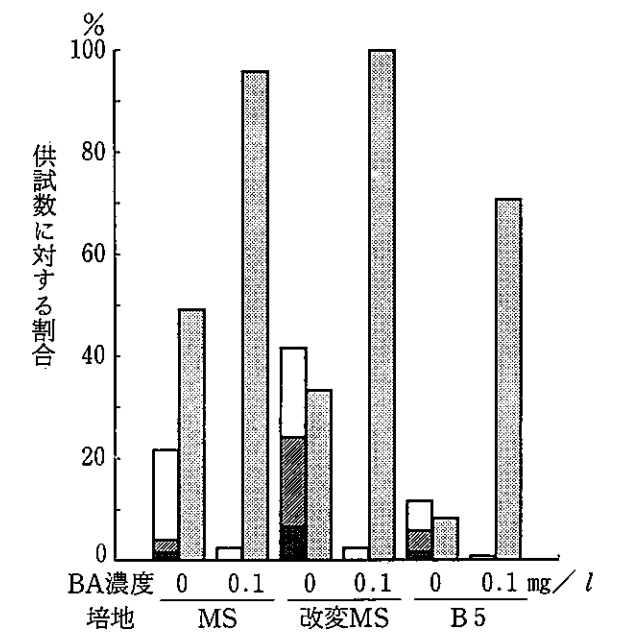
完熟種子子葉では、いずれのホルモン条件でも不定胚形成はみられず、2,4-Dを含んだ培地ではカルスが形成され、IAAを含んだ培地では根が発生した。

未熟種子子葉では、2,4-Dを含んだ培地で培養した場合にはカルスの形成のみがみられ、IAAを含んだ培地ではカルスが形成されるものと、置床した子葉全体が拡大するものがみられた。また、不定胚はIAA1.0mg/lのみを添加した区とホルモンフリー区で誘導され、その形成率はホルモンフリー区で高かった。

未熟胚では、BA0.1mg/l+2,4-D1.0mg/l添加区のみでカルスが形成され、他の区では不定胚が形成されるものと未熟胚の胚軸が伸長するもの、あるいは置床した未熟胚が発芽するものが観察された。不定胚形成率は、BA0.1mg/l+IAA1.0mg/l添加区が最も高く、次いでホルモンフリー区であった。

### 2) 培地の種類と不定胚形成

前述の実験で不定胚は未熟種子の子葉及び未熟胚から誘導できることが明らかとなった。そこで、材料採

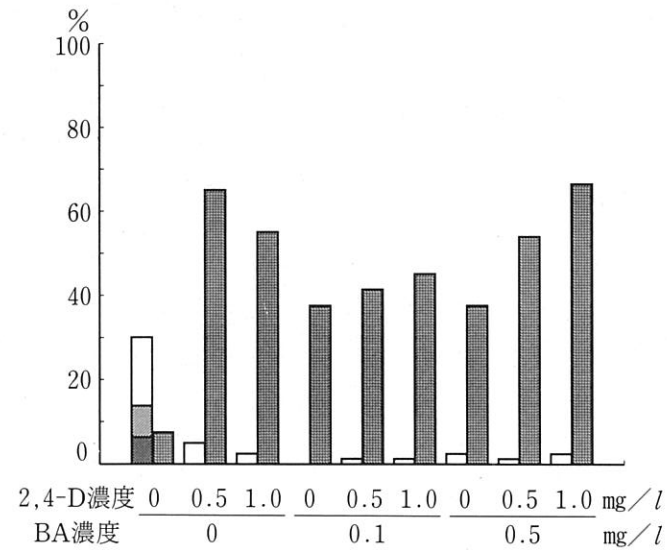


第1図 培地の種類と不定胚形成及び子葉拡大

不定胚形成 ■■■ ++ ■■■ + □ ± 子葉拡大 ■■■

取の容易な未熟種子を用い、不定胚形成に適した培地について検討し、不定胚形成あるいは子葉拡大のみられた切片の割合を第1図に示した。

供試した3種類の培地は、いずれも不定胚形成が可能であったが、その中ではワサビ用改変MS培地での不定胚形成率が最も高く、供試材料の約40%で不定胚の形成がみられ、不定胚の形成程度も++あるいは+



第2図 BAおよび2,4-D濃度と不定胚形成  
不定胚形成 ■++ ■+ □± ■カルス形成

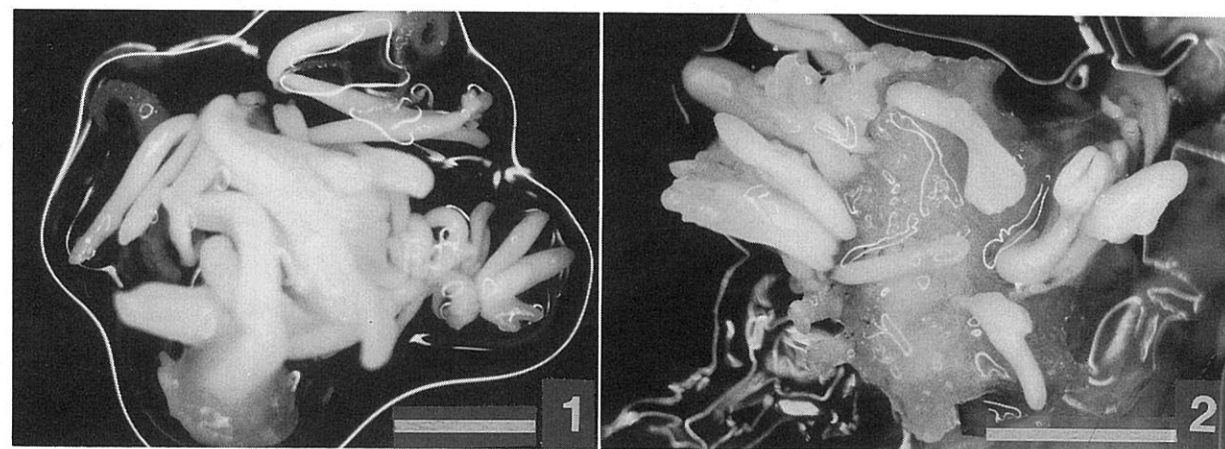
不定胚形成率はホルモン無添加区で高く、供試個体の約30%で観察された。そのうち++あるいは+と評価したものがそれぞれ約1/4ずつあり、不定胚形成

のものが多かった。しかし、BAを添加した場合には置床した子葉切片が大きくなり、不定胚形成は阻害された。MS培地、B5培地でもBAを添加した場合には不定胚形成率が低下し、子葉の拡大する割合が増加した。

### 3) BA及び2,4-Dの濃度と不定胚形成

ワサビ用改変MS培地を用いてBA及び2,4-D添加の効果を検討した結果を第2図に示した。

量も多かった。ホルモンフリー区での不定胚形成状況を第3-1図に示した。不定胚は置床した子葉切片の



第3図 未熟種子に形成された不定胚

1. ホルモンフリー区 (バーの長さは1mm).
2. BA 0.1mg/l+2,4-D 0.5mg/l添加区. 子葉にカルスが形成されている (バーの長さは1mm).

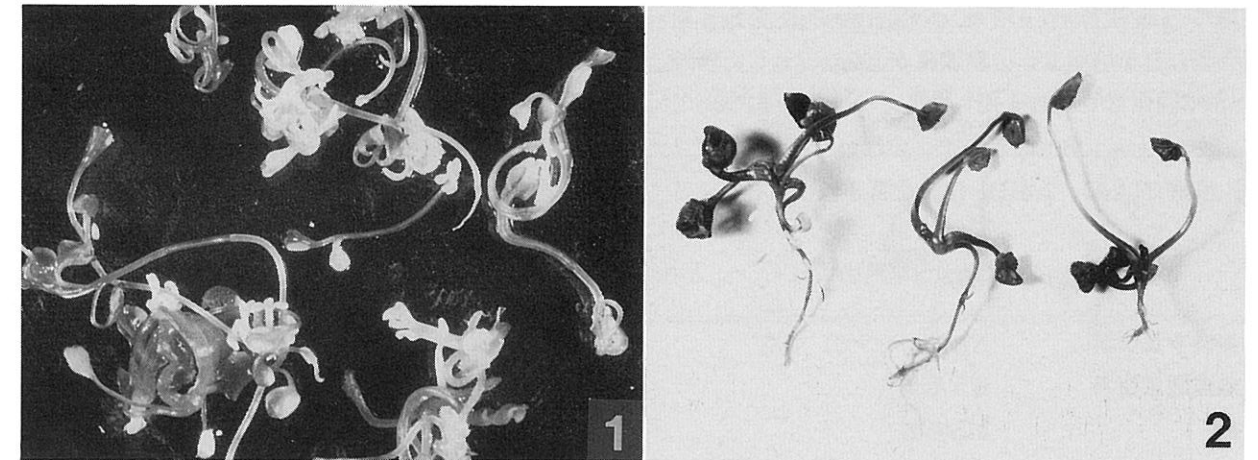
表面から子葉全体を覆うように発生した。これに対してBAあるいは2,4-Dを添加した区では不定胚形成率が低く、形成程度も低かった。

カルス形成率は不定胚形成とは反対にホルモン添加区で高く、また、BAと2,4-Dを共存させた場合に形成量が多くなる傾向にあった。第3-2図に示すように、

BA及び2,4-D添加区では、置床した未熟種子子葉の表面全体に密で硬いカルスが形成され、同時に、子葉切片の周辺部から不定胚が形成された。ここで形成されたカルスのみを切り取り、同種の培地あるいはホルモ

ンフリー培地に移植したが、不定胚は形成されなかった。

また、培地にBAを単独で添加した場合には前実験と同様に高率で子葉が拡大する現象が観察された。



第4図 不定胚の発芽と植物体再生

1. 子葉が展開、胚軸が伸長している。
2. 子葉、本葉、胚軸が区別できる。

### 4) 植物体再生と二次的に形成された不定胚の培養

第4-1図に不定胚の発芽状況を示した。置床した不定胚の一部は培養2週間後頃から胚軸が伸長し、子葉が展開した。更に、培養1か月後頃から本葉が発生した。本葉の発生した個体を第4-2図に示した。伸長した胚軸、根、子葉、本葉の区別が明らかであり、種子が発芽したものとはほぼ同様な形態を示した。

また、第4-1図にみられるように、展開した子葉あるいは発芽しない不定胚の子葉に二次胚形成のみられる個体も観察された。発芽しない不定胚の表面に形成された不定胚を同種の培地に移植したところ、黒変して枯死するものが多かったが、一部の不定胚ではその表面に再び不定胚が形成された。これを液体培地に

移植して液体振とう培養を行ったところ、約10日間で第5図に示すように不定胚塊が形成された。更に、これを分割し、継代培養を繰り返すことにより、不定胚の維持・増殖が可能であった。

### III. 薬からの不定胚形成

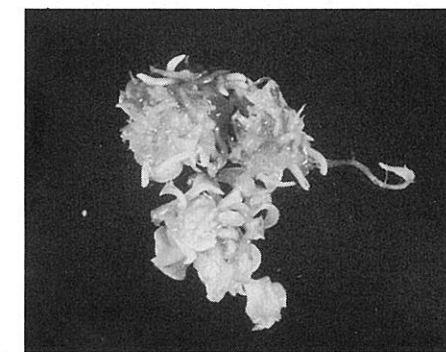
不定胚は、体細胞のみではなく、生殖細胞である花粉からも誘導されることが多くの作物で報告されている<sup>35,37)</sup>。ワサビの属するアブラナ科ではナタネ、ハクサイなどのBrassica属で薬培養あるいは花粉培養によって花粉起源の不定胚を形成した多くの例がある<sup>17,18,19,26)</sup>。Brassica属では薬培養、花粉培養によって得られた植物体は、半数体あるいは半数体が自然倍加した2倍体であるため、品種改良に利用することができ、ハクサイでは、新品種として‘オレンジクイーン’が育成されている<sup>28)</sup>。

そこで、ワサビにおける薬培養による不定胚の形成について検討した。

#### 1. 実験材料及び方法

##### 1) 培地の種類及びオーキシンと不定胚形成

材料は、‘さんべ’自殖第3代の1個体をクローン増殖したものを利用した。この材料をガラス室内で栽培し、2~3月に抽苔させ、長さ1~2mmのつぼみを採取し



第5図 二次胚形成によってできた不定胚塊



て用いた。つぼみは70%エタノールで30秒、有効塩素1%の次亜塩素酸ナトリウム溶液で10分間滅菌した後、滅菌水で3回洗浄し、薬を摘出して培地を入れた9cmプラスチックシャーレに10個ずつ置床した(以下の実験同様)。培地は、第2表のように改変したNITSCH培地<sup>34)</sup>(改変NITSCH培地)、KELLERの改変B5培地<sup>18,19)</sup>、B5培地でしょ糖濃度を100g/lとし、寒天0.8%で固化したものを用いた。オーキシンについては、改変NITSCH培地のホルモンの代わりに、 $\alpha$ -ナフチル酢酸(NAA)、2,4-D、IAAを第3表に示したよう

第2表 改変NITSCH培地の成分

無機多量要素	NITSCH (1969) 培地	
無機微量要素	B5 培地	
Fe	MS培地	
ビタミン	NITSCH (1969) 培地	
糖	しょ糖	100g/l
添加アミノ酸	L-グルタミン	800mg/l
	L-セリン	100mg/l
添加ホルモン	2,4-D	0.1mg/l
	NAA	0.1mg/l

に組合わせて添加した。30°C暗黒条件で2日間前処理を行った後、20°C暗黒条件で培養し、培養35日後に不定胚形成数を調査した。

2) BA添加と不定胚形成

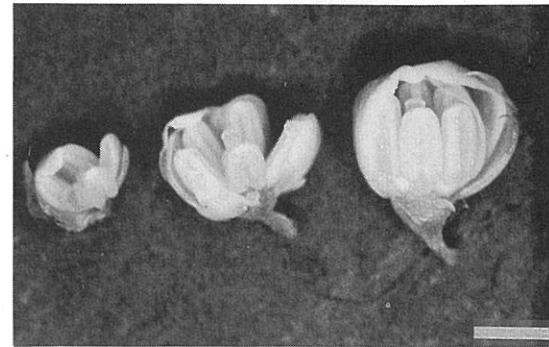
ガラス室内で栽培したワサビ'島根3号'の薬を、BAを添加した改変NITSCH培地に置床して培養した。BA濃度は0, 0.02, 0.1mg/lとし(第4表)、培地はしょ糖を100g/l添加し、0.8%の寒天で固化して用いた。調査は培養60日後に行った(以下の実験同様)。

3) 前処理の温度及び日数と不定胚形成

Brassica属での薬培養、花粉培養では不定胚形成率の向上のために前培養として高温処理が行なわれている<sup>35)</sup>。そこで、ワサビについても高温処理の効果をみるために、ワサビ'さんべ'自殖第3代の薬を改変NITSCH培地に置床し、前培養における温度と処理日数を検討した。温度条件に関する実験では、前処理を20, 25, 30, 35°Cで行い、処理日数はいずれも2日間とした(第5表)。前処理の日数についての実験では、前処理の温度を30°Cとし、処理日数は1, 2, 3, 5日とした(第6表)。

4) 薬のステージと不定胚形成

ワサビ'島根3号'を用い、2月に採取したつぼみから異なったステージの薬を取り出して培地に置床した。薬のステージは、Brassica属の作物で行われているように<sup>26,35)</sup>花弁長と薬長の比を基準にし、花弁長/薬長の値が0.5~1.0, 1.0~1.5, 1.5~2.0の3種類の範囲に入るつぼみから薬を取り出した(第7表)。花弁長/



第6図 つぼみの大きさと薬のステージ (バーの長さは1mm)

薬長の値とつぼみの大きさはワサビの生育状況によって必ずしも一致しないが、第6図に示すように、今回の試験では花弁長/薬長の値が1.0, 1.5, 2.0のものはつぼみの長さがそれぞれ約1.0, 1.5, 2.0mmであった。培地は、改変NITSCH培地を用いた。

5) アミノ酸の添加量と不定胚形成

ワサビ'島根3号'から採取した花弁長/薬長の値が1.0~2.0のつぼみから取り出した薬を培地に置床した。培地は、改変NITSCH培地をもとにして、添加するグルタミンとセリンの量を2, 4, 8倍にしたものを供試した(第8表)。

6) 植物体再生と染色体数の調査

形成された不定胚からの植物体再生は、ホルモンフリーのワサビ用改変MS培地を用い、20°C, 3000lx, 12時間日長の条件で行った。

染色体の観察は倉田らの方法<sup>23,24)</sup>をもとにして行った。培養中に伸長した根の先端を5~10mmの長さに切り取り、水に浸漬した状態で0°C, 16時間の低温処理を行った後、メタノール酢酸固定液(メタノール3:酢酸1)で固定した。固定した材料を純水に浸漬して固定液と水を置換した後、スライドガラス上へのせ、細胞単離用酵素液(4%セルラーゼオゾズカRS, 1%ペクトリアーゼY23, 75mM塩化カリウム, 7.5mMエチレンジアミン4酢酸2ナトリウム, pH4.0)を2~3滴滴下し、40°Cで30~40分間インキュベートし

た。その後、固定液で酵素液を十分洗い流し、スライドガラス上でピンセットを用いて根端を細かく砕いた。更に固定液を1滴滴下し、火をつけ、乾燥させた。その後、市販のギムザ液をpH6.8の1/15Mリ

ン酸バッファーで30倍に希釈した染色液を用いて約30分間染色し、その後流水で水洗して観察した。

2. 実験結果

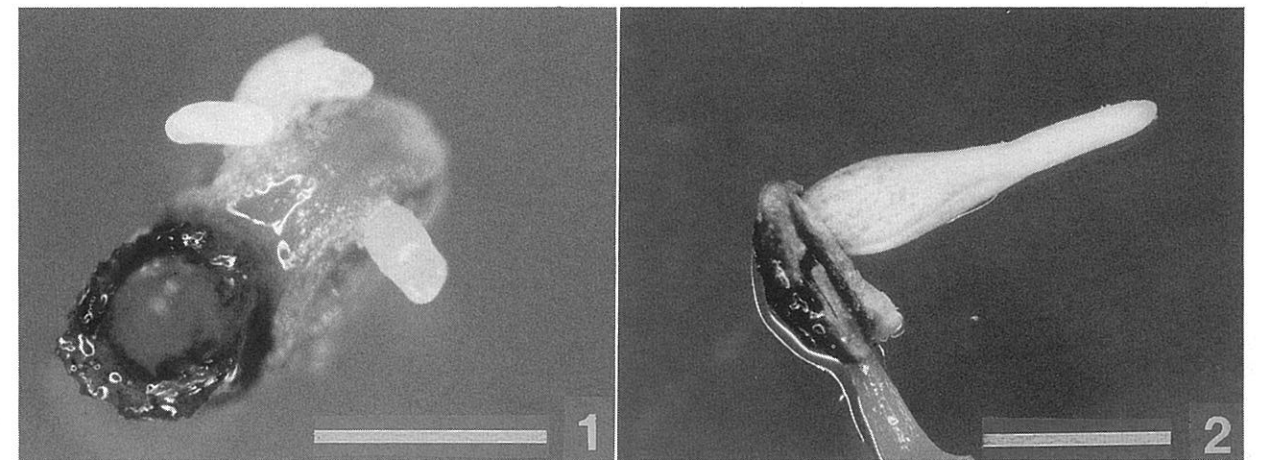
1) 培地の種類及びオーキシンと不定胚形成

第3表 薬培養における培地及びオーキシンと不定胚形成

培地	添加ホルモン			供試数	不定胚を形成した薬の数	形成された不定胚数	植物体に再生した不定胚数
	NAA	2,4-D	IAA				
改NIT.	mg/l	mg/l	mg/l	86	1	3	2
	0.1	0.1	0	71	0	0	0
	0	0	0.2	48	0	0	0
KELLER	0.1	0.1	0	75	0	0	0
	0	0.1	0.1	84	0	0	0
	0	0	0.2	60	0	0	0
B5	0.1	0.1	0	98	0	0	0
	0	0.1	0.1	72	0	0	0
	0	0	0.2	74	0	0	0

薬からの不定胚形成に適した培地、オーキシンの種類と濃度を検討した結果を第3表に示した。不定胚は改変NITSCH培地でのみ形成され、第7-1図に示すよ

うに、薬壁を突き破るようにして発生した。不定胚を形成した薬は供試した86個のうち1個のみで、形成された不定胚は3個であった。



第7図 薬から発生した不定胚

- 1. 薬壁をつきやぶって発生した不定胚 (バーの長さは1mm)。
- 2. 幼根を外側にして発生した不定胚 (バーの長さは1mm)。

2) BA添加と不定胚形成

不定胚が形成された改変NITSCH培地にBAを添加して不定胚形成を調査したところ、第4表に示すように、BA0.02mg/l添加区及び無添加区で不定胚形成が認

められた。不定胚は前述の実験と同様に、薬壁を突き破って発生したものが多かったが、第7-2図に示すように、幼根を外側に向けて薬壁から飛び出した状態で形成されているものもみられた。

## 3) 前処理の温度及び日数と不定胚形成

第5表および第6表に示したように、不定胚の形成は前処理温度30°Cのみでみられ、処理日数については2日あるいは3日の場合に認められた。

## 4) 薬のステージと不定胚形成

培養結果は第7表に示した。不定胚形成は花卉長/薬長の値が1.0~2.0のつぼみから摘出した薬でみられ、その中でも1.5~2.0のつぼみから取り出した薬で不定胚形成数が多い傾向にあった。

第5表 前処理の温度と不定胚形成

前処理温度	供試数	不定胚を形成した薬の数	形成された不定胚数	植物体に再生した不定胚数
°C				
20	170	0	0	0
25	270	0	0	0
30	252	1	1	0
35	306	0	0	0

注) 処理日数2日

第4表 BA添加と不定胚形成

BA濃度	供試数	不定胚を形成した薬の数	形成された不定胚数	植物体に再生した不定胚数
mg/l				
0	320	1	1	0
0.02	340	2	2	1
0.1	350	0	0	0

第6表 前処理の日数と不定胚形成

前処理日数	供試数	不定胚を形成した薬の数	形成された不定胚数	植物体に再生した不定胚数
日				
1	276	0	0	0
2	288	4	6	0
3	342	1	1	0
5	84	0	0	0

注) 処理温度30°C

第7表 薬のステージと不定胚形成

花卉長/薬長	供試数	不定胚を形成した薬の数	形成された不定胚数	植物体に再生した不定胚数
0.5~1.0	240	0	0	0
1.0~1.5	260	1	1	0
1.5~2.0	310	3	3	1

## 5) アミノ酸の添加量と不定胚形成

NITSCH培地では窒素源として無機塩ばかりでなく、グルタミンとセリンを利用しているが、その添加量について検討した結果を第8表に示した。グルタミン及びセリンの無添加区では不定胚はまったく形成されな

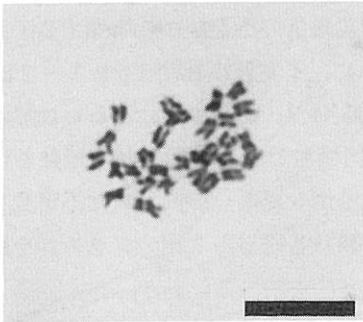
かったのに対して、添加区では形成された。また、アミノ酸の添加量が少ないほうが不定胚形成率が高い傾向が認められ、NITSCH培地で用いられている濃度(グルタミン800mg/l, セリン100mg/l)で不定胚形成率が高かった。

第8表 アミノ酸添加量と不定胚形成

添加アミノ酸		供試数	不定胚を形成した薬の数	形成された不定胚数	植物体に再生した不定胚数
グルタミン	セリン				
mg/l	mg/l				
0	0	480	0	0	0
800	100	960	4	9	2
1600	200	960	0	0	0
3200	400	960	1	3	0
6400	800	960	1	1	0

### 6) 植物体再生と染色体数の調査

植物体に再生した不定胚の数は第3表から第8表に示した。今回の実験で形成された不定胚は植物体への再生率が低く、すべての実験で形成された31個の不定胚のうち再生したものは6個にすぎなかった。また、3個体では、未熟種子子葉あるいは未熟胚から形成された不定胚と同じようにその表面に二次胚形成が観察された。



第8図 薬培養により形成された不定胚から再生した植物体の染色体 (バーの長さは10 $\mu$ m)

以上のようにして形成された不定胚から再生した植物体の染色体数を調査したところ、第8図に示すように2n=28で半数体は認められなかった。

薬由来の不定胚から再生した個体は、未熟種子に形成された不定胚から再生した個体や、試験管内分割増殖法で得られた個体に比べて生育が悪く、増殖率も劣った。順化後定植したところ、2年後に開花株がみられ、自家受粉を行ったが結実しなかった。

## IV. 二次胚形成を利用した不定胚の増殖

現在、多くの植物でカルスを利用した不定胚形成およびその再生系が確立されている<sup>32,33)</sup>。これは、不定胚形成能のあるカルスを形成させ、カルスの増殖能力を利用して大量増殖系を確立したものである。しかし、カルスでは増殖時に変異が発生する可能性があり、メロンでは再生した植物体に変異の発生したものが多いことが報告されている<sup>3)</sup>。

筆者らは、ワサビにおいて未熟種子などから不定胚を形成させた場合には、ホルモンフリー条件でその表面に二次胚形成が認められ、更に、この不定胚を液体培地で継代培養することにより、不定胚を維持・増殖できることを報告した<sup>10)</sup>。この二次的に形成された不定胚は、カルスを経由せずに不定胚の表面から形成さ

れるもので、植物体が再生された場合には変異が少ないものと考えられる。このような二次胚形成を利用して安定した増殖系を開発することができれば、新しい増殖体系が確立することになる。そこで、今回報告した未熟種子、未熟胚あるいは薬から形成された不定胚を利用した増殖方法を検討した。

### 1. 実験材料及び方法

#### 1) 蓋の種類と不定胚の増殖

材料は、第5図に示したような、ホルモンフリーのワサビ用改変MS培地で液体振とう培養(旋回式)によって維持増殖を続けている不定胚塊を分割して利用した。100ml三角フラスコに50mlのワサビ用改変MS培地を入れ、約1gの材料を入れて20°C暗黒条件で液体振とう培養(旋回式, 100rpm)を行った。蓋はサンキャップシート(岩城硝子)、ポリエチレンフィルム、ポリ塩化ビニリデンフィルムを利用した。サンキャップシートは、ポリプロピレンで覆ったアルミ箔に直径9mmの除菌フィルターを付けた製品(岩城硝子カタログ参照)であり、ポリエチレンフィルム及びポリ塩化ビニリデンフィルムは、それぞれを素材にした家庭用ラップフィルムを用いた。培養は15日間行い、培養前後の重量を測定し、不定胚小塊の増殖率を調査した。

また、同様にして、サンキャップシート、ポリエチレンフィルムを蓋にして、培地に添加する糖をグルコース10g/l、グルコース20g/l、しょ糖20g/lの3種類に変更して不定胚小塊の増殖率を調査した。培養時の重量は0.5gとし、培養12日後に培地を更新した。調査は培養12日後の培地更新時と更に12日間培養した培養24日後に行い、不定胚の重量を測定した。

実験は各区とも三角フラスコを2個ずつ用いて行った(特記しない限り以下の実験同様)。

#### 2) 培地の成分と不定胚の増殖

培地の糖濃度、アンモニウムイオン濃度の影響をみるために次の実験を行った。前述と同様な不定胚小塊を、50mlの培地を入れてサンキャップシートで蓋をした100mlフラスコを用いて、20°C暗黒条件で15日間培養を行い、培養の前後で不定胚の重量を測定した。培地はワサビ用改変MS培地を基本にし、しょ糖濃度のみを10, 20, 40, 80g/lに変更したもの、あるいは硝酸アンモニウムの代わりに硫酸アンモニウムを200, 400, 800, 1600mg/l添加したものをを用いた(第12図)。

更に、培地の窒素成分としてグルタミンを利用した場合の効果について検討した。ワサビ用改変MS培地の窒素源である硝酸アンモニウムと硝酸カリウムの代

わりにL-グルタミンと硝酸アンモニウムを用い、それぞれの濃度が0-15mM, 5-10mM, 10-5mM, 15-0mMとなるように基本培地を変更して用いた(第12図)。カリウムイオンの濃度は、ワサビ用改変MS培地と同濃度になるように塩化カリウムを用いて調整した。

### 3) 培地の窒素成分の変化

ワサビ用改変MS培地及び、培地の窒素、カリウム成分を変更(ワサビ用改変MS培地の硝酸アンモニウム、硝酸カリウムをL-グルタミン5mM, 硝酸アンモニウム10mM, 塩化カリウム9.4mMに変更)した培地(AA培地と略す)で不定胚小塊を培養し、培地のアンモニウムイオン、硝酸イオン、グルタミンの濃度の変化及び不定胚の重量を測定した。100ml三角フラスコに50mlの培地と0.3gの不定胚小塊を入れ、20°C暗黒条件で巡回式振とう培養(100rpm)を行った。実験はそれぞれ3個のフラスコで行い、培養開始時、培養7日後および14日後に不定胚小塊の重量を調査した。

アンモニウムイオンの定量は富士平工業株式会社製の試薬を用いたインドフェノール法を利用して行った。硝酸イオンの定量は、HPLC(WatersHPLCモジュール1)を利用した。カラムはIC-Pak Anionを、溶離液はBorate/Gluconate溶離液(Watersカラム取り扱い説明書参照)を用い、流速は1.2ml/min.とし、214nmで吸光度を測定して定量した。

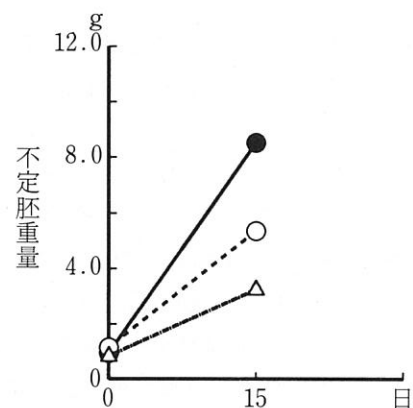
グルタミン濃度はHPLC(WatersHPLCモジュール1)を利用し、PICO-TAG法(Waters PICO-TAG法説明書に記載されている方法)及び桑野らの方法<sup>25)</sup>を簡易化してPTCアミノ酸を生成させて測定した。試験管にエタノール0.7ml, トリエチルアミン0.1ml, チオイソシアン酸フェニル0.1mlを入れよく混合したのち、試料を0.1ml添加して混合後20分間室温で放置した。その後、PICO-TAG溶離液A(Waters PICO-TAG用, 和光純薬)9mlで希釈し、0.45ミクロンのフィルターで濾過した試料をHPLC(Watersモジュール1)で分析した。カラムはマイクロボンドスフェア5 $\mu$ C 18-100Å(Waters), 溶離液はPICO-TAG溶離液Aを用い、流速は1.0ml/min.とし、254nmの吸光度を測定して定量した。

### 4) 不定胚表面からの不定胚形成数

二次胚形成により不定胚表面に形成される不定胚数を知るために、液体培養によって増殖した不定胚を培養し、その表面に新たに発生した不定胚の数を調査した。培地はワサビ用改変MS培地を用い、添加するしよ

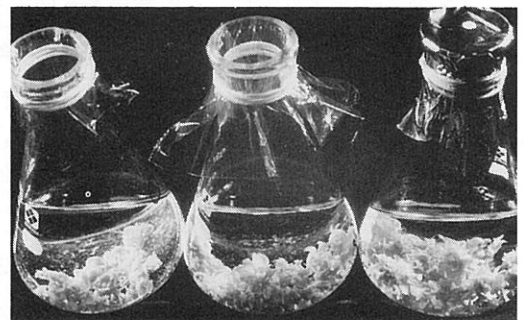
糖濃度は0, 10, 20, 40, 80g/lとした。この培地50ml入れた100ml三角フラスコに、ほぼ完全な形の定胚20個あるいはそれを1-2mm角に細断したものを入れ、20°C暗黒条件で液体振とう培養(100rpm巡回)を行った。各試験区ともそれぞれ2個(A, Bとする)のフラスコで実験を行い、培養10日後に不定胚の表に形成された不定胚数を調査した。不定胚数は、奇のもの、完全に分離していないが分離可能なものをめて魚雷型以上に生育したものを調査した。

また、一定重量の不定胚から増殖する不定胚数を査するために、不定胚小塊約1gを1-2mm角に細し、BA添加(0.1, 0.5mg/l)あるいは無添加のワサビ用改変MS培地で1か月間振とう培養を行い(10日間隔で2回培地を更新)、形成された不定胚小塊数を査した。実験は各区とも3個のフラスコを用いて行った。



第9図 蓋の種類と不定胚増殖

- サンキャップシート
- - -○ ポリエチレンフィルム
- △- - -△ ポリ塩化ビニリデンフィルム



第10図 液体培養による不定胚の増殖状況

- (左) ポリ塩化ビニリデンフィルム
- (中) ポリエチレンフィルム
- (右) サンキャップシート

2. 実験結果

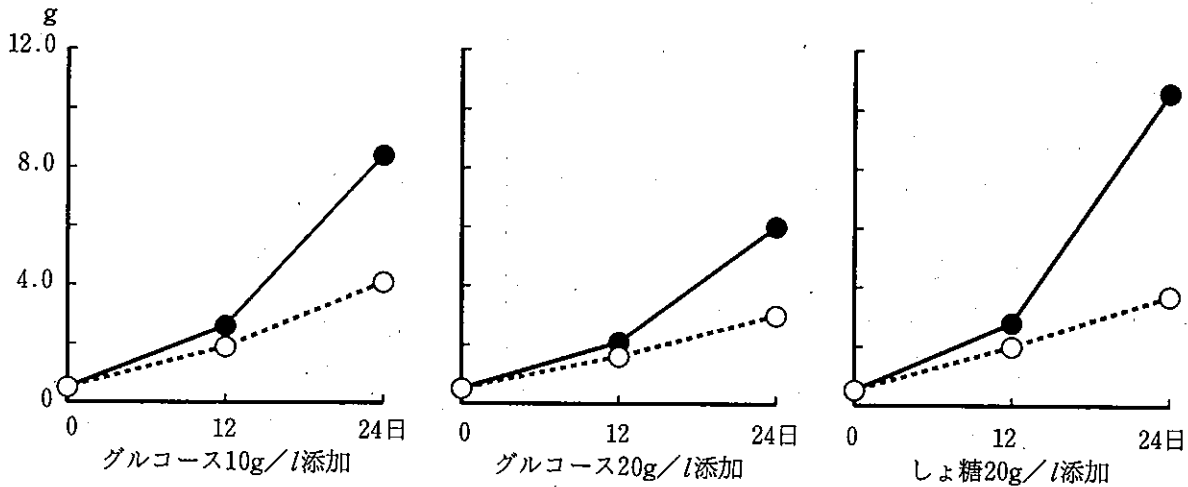
1) 蓋の種類と不定胚の増殖

蓋の種類について検討した結果を第9図に、増殖状況を第10図に示した。

ポリ塩化ビニリデンフィルムに比べて、ポリエチレンフィルムと通気フィルター付きのサンキャップシートを蓋にした場合には不定胚の増殖率がよかった。特

に、サンキャップシートを利用した場合にはポリ塩化ビニリデンフィルムに比べて培養15日後には2倍以上の重量になった。

次に不定胚の増殖率が高かったサンキャップシートとポリエチレンフィルムを蓋に使って、培地に添加する糖の種類と濃度について検討し、その結果を第11図に示した。



第11図 糖の種類、濃度と不定胚増殖

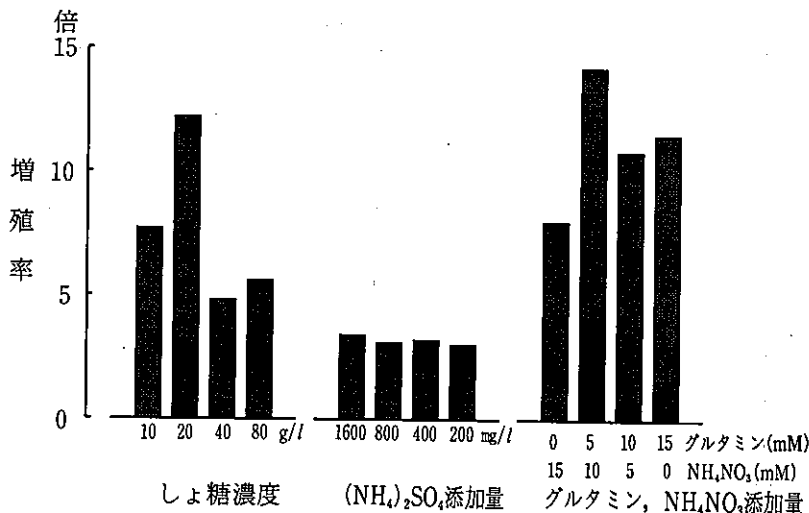
●—● サンキャップシート  
○- - - ○ ポリエチレンフィルム

培養12日後の調査では蓋の種類によって増殖率に大きな差はなかったが、24日後の調査では、ポリエチレンフィルムに比べて、サンキャップシートを蓋に使用した場合には、不定胚の増殖率が2~3倍になった。その際、培地に添加する糖としてしょ糖を用いた場合に増殖率が向上した。グルコース濃度については、20g/l添加区に比べて10g/l添加区の方が増殖率が高

かった。また、12日後の調査ではグルコース10g/lとしょ糖20g/lでは大きな差はなかったが、24日後の調査では、しょ糖20g/l添加区が増殖率が高かった。

2) 培地成分と不定胚の増殖

培地成分と不定胚増殖について検討した結果を第12図に示した。



第12図 培地成分と不定胚の増殖



しよ糖濃度を変えた場合の増殖率はしよ糖濃度20g/lが最もよく、これに10g/l区が次ぎ、40g/lおよび80g/l添加区は明らかに低かった。培地の窒素成分について、硝酸カリウム濃度をワサビ用改変MS培地の濃度と等しくし、硫酸アンモニウム添加量を変えて培養した場合には、アンモニウムイオン濃度による増殖率の差はほとんどみられなかった。これに対して、窒素源としてグルタミンと硝酸アンモニウムを用い、その割合を変えて検討したところ、グルタミンを全く含まないものに比べてグルタミンを含んだ区の方が増殖率が高い傾向が認められた。特に、グルタミン5mMと硝酸アンモニウム10mMを添加した区で増殖率が高かった。

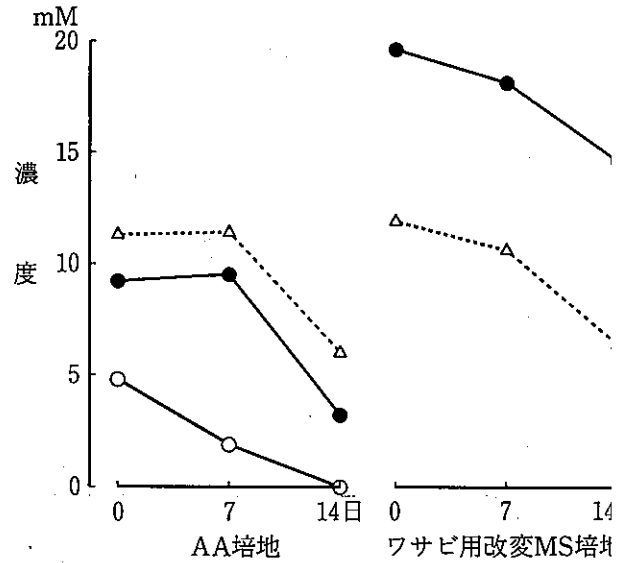
3) 培地の窒素成分の変化

第13図および第9表に培地の窒素成分の変化と不定胚の重量増加を示した。AA培地におけるグルタミン濃度は、7日後には1/2以下に減少し、14日後には0になった。これに対して硝酸イオン、アンモニウムイオンは7日後の調査ではほとんど減少はみられず、14日後の調査で減少が認められた。ワサビ用改変MS培地における硝酸イオン、アンモニウムイオンは、7日後の調査ではわずかに減少し、14日後の調査では減少量が大きくなった。14日後の不定胚重量は、AA培地で5.6g(約19倍の増殖率)となり、ワサビ用改変MS培地での2.7g(約9倍の増殖率)より明らかに大きな値を示した。

4) 不定胚表面からの不定胚形成数

これまでの実験は不定胚全体の重量を測定して不定

胚の増殖量を推定してきた。しかし、この増殖系で行われた不定胚塊には融合した不定胚や奇形不定胚が多く含まれており、増殖した不定胚の数は明らかでなかった。そこで、分離できる不定胚を奇形のもの、融合したものも含めて数えた結果を第10表に示した。



第13図 不定胚小塊の培養によるN成分の経時変化

●—● NO<sub>3</sub><sup>-</sup>濃度  
 △.....△ NH<sub>4</sub><sup>+</sup>濃度  
 ○—○ グルタミン濃度

第9表 グルタミン添加と不定胚増殖

培地	培養開始時重量	14日後重量
	g	g
AA培地	0.3	5.6
ワサビ用改変MS培地	0.3	2.7

第10表 不定胚の増殖状況

材 料	糖濃度 g/l	不 定 胚 数		備 考
		フラスコA	フラスコB	
不 定 胚	0	—	—	褐変枯死
	10	53	39	奇形の不定胚多い
	20	27	75	Bでは一部褐変、小型の不定胚多数発生
	40	71	58	小型の不定胚多数発生
	80	36	43	奇形のもの多い
細断した 不 定 胚	0	—	—	褐変枯死
	10	10	24	小型の不定胚発生
	20	8	—	Bでは褐変枯死、小型の不定胚多数発生
	40	4	—	Bでは褐変枯死
	80	—	—	褐変枯死

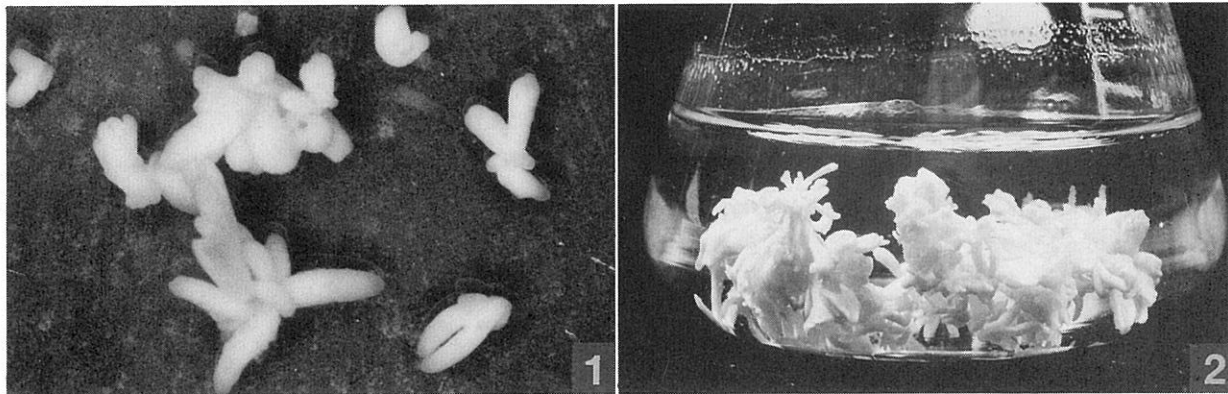
これによると、完全な不定胚を培養した場合、20個の不定胚から27~75個の分離可能な不定胚が得られ、10日で不定胚数は1.4~3.5倍に増加することが明らかとなった。特に、20g/lあるいは40g/lのしょ糖を添加した場合に形成される不定胚数が多かった。前述の実験ではしょ糖濃度10~20g/lで重量増加が大きいことを示したが、不定胚数を調査したこの実験ではそれよりやや高い20~40g/lで不定胚数が多くなる傾向にあった。また、細断した不定胚を10日間培養した場合には形成された不定胚数は少なく、短期間の培養では増殖率は低かった。

次に、不定胚小塊を細断した断片を、異なった濃度のBAを添加した培地で1か月間培養した結果を第11表に、断片からの不定胚形成状況を第14図に示した。培養10日後頃から細断片表面に不定胚が形成され始め、1か月後には第14-1図に示すように培養した小片の表面から不定胚が放射状に発生し、不定胚の小さ

な塊が形成された。不定胚小塊形成はホルモンフリーあるいはBA0.1mg/l添加培地で良好で、80~90個形成された。それぞれの小塊には不定胚が2~5個形成されているので約1か月後には約1gの不定胚断片から160~450個の不定胚が形成されることになる。形成された不定胚小塊を新しい培地に移植し、培養を続けると第14-2図に示すようにさらに大きな塊が形成された。

表11表 BA濃度と形成される不定胚小塊

BA添加量 mg/l	形成された不定胚小塊数
0	80
0.1	91
0.5	67



第14図 不定胚表面からの不定胚形成

1. 不定胚細断片への形成
2. 不定胚小塊の液体培養により形成された不定胚塊

## V. 不定胚からの植物体再生

これまでの実験により、不定胚からの植物体再生が可能であることを明らかにしたが、その再生率は低かった。現在までに不定胚が形成されることが報告されている植物でも、ニンジンなどごく一部の植物を除いては植物体再生率が低く、再生率の向上が重要な課題となっている<sup>33)</sup>。胚の成熟にはアブサイシン酸 (ABA) が重要な役割を果たしていることが知られており<sup>16)</sup>、ナタネではABA添加が効果的であるとの報告がある<sup>17)</sup>。

ワサビにおいても、不定胚からの植物体再生率を向

上させるために、培地の濃度、添加する糖とホルモンの種類、培地の窒素濃度、ABA添加の効果について検討した。

### 1. 実験材料及び方法

#### 1) 培地の種類及び濃度と植物体再生

ワサビ用改変MS培地による液体振とう培養で増殖して得られた不定胚小塊 (直径3~5mm) を用いた。培地はワサビ用改変MS培地、同培地を1/2又は1/4に希釈したもの、B5培地、同培地を1/2に希釈したものをジェランガム0.2%で固化して用い、20°C、3000lx、12時間日長で50日間培養した (第15図)。培養には9cmプラスチックシャーレを用い、各シャーレに10個ずつ各区4~5枚のシャーレに置床した。培

養終了後、植物体再生の有無、不定胚の増殖（二次胚形成の有無）について調査を行った。植物体再生については、本葉の発生の有無を指標として、不定胚が生育して本葉が発生したものを植物体が再生した個体とした。以下の実験で特記しない限り材料、培養条件、調査方法は同一とした。

2) 糖の種類及びジベレリン添加と植物体再生

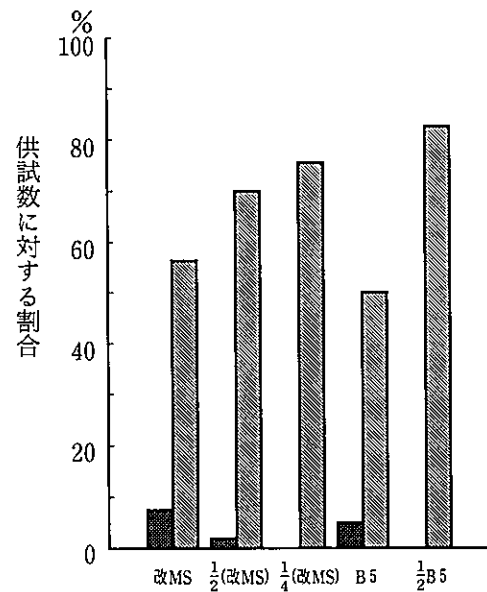
ワサビ用改変MS培地および同培地の糖をマルトース20g/lに変更した培地に、第16図に示したようにジベレリン (GA) 0.5mg/l添加の有無を組み合わせさせた培地を用いて実験を行った。培地はゼランガム0.2%で固化して用いた。培養には各区6枚の9cmプラスチックシャーレを用い、30日間培養を行った。

3) 培地のアンモニウムイオン濃度及び硝酸イオン濃度と植物体再生

ワサビ用改変MS培地において硝酸アンモニウムの代わりに硫酸アンモニウムと硝酸ナトリウムをそれぞれ800-0mg/l, 400-500mg/l, 0-1000mg/l添加した培地を用いて実験を行った(第17図)。培養には各区8枚のシャーレを用いた。

4) 前培養でのABA処理の効果及び再生培地での糖の種類と植物体再生

不定胚を植物体再生培地で培養する前に、ABAを含んだ培地で前培養した場合の効果を検討した。前培養では、第12表に示したように、ワサビ用改変MS培地にABAを0, 0.2, 0.4, 0.8mg/lの濃度で添加して用い、不定胚小塊を、10あるいは20日間20°C, 300lxで振とう培養(巡回式100rpm)を行った。その後、0.5mg/lの



第15図 培地の種類、濃度と本葉発生及び不定胚増殖

GAを添加したワサビ用改変MS固形培地を用いて30日間培養した。培養にはABA無添加区では8枚、ABA添加区では13枚のシャーレを用いた。調査は本葉の発生、組織の肥大、不定胚の増殖（二次胚形成）について行った。

また、上記と同様にABA添加培地を用いて暗黒条件下で10日間液体培養したものについて、しよ糖あるいはマルトースを20g/l添加したワサビ用改変MS培地 (GA0.5mg/l添加) に置床して培養を行った(第13表)。培養は各区とも5枚のシャーレを用いて行った。

2. 実験結果

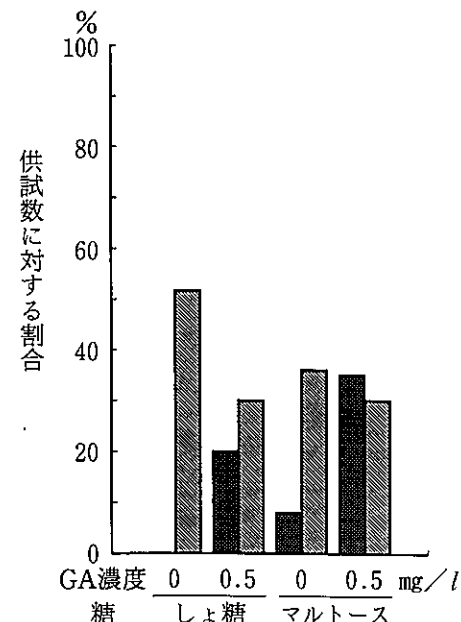
1) 培地の種類及び濃度と植物体再生

培地の種類と、本葉発生、不定胚増殖のみられた不定胚小塊の割合を第15図に示した。本葉の発生した不定胚小塊の割合はいずれの区でも低率であったが、希釈しないワサビ用改変MS培地あるいはB5培地が比較的良好で、希釈するにしたがって、本葉発生率が低下した。二次胚形成は本葉発生とほぼ逆の傾向がみられ、希釈した培地で高率に観察された。

2) 糖の種類及びジベレリン添加と植物体再生

添加する糖の種類、GA添加の有無と本葉発生、不定胚増殖について調査した結果を第16図に示した。

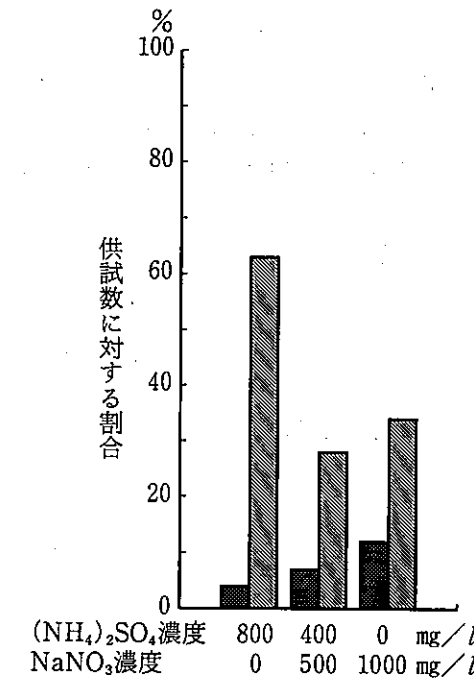
糖については、マルトースを用いた場合にしよ糖に比べて本葉発生率がやや高い傾向がみられた。また、GAの添加は本葉発生率を向上させた。二次胚形成については前述の試験と同様に本葉の発生とほぼ逆の傾向がみられた。



第16図 糖の種類、GA添加と本葉発生及び不定胚増殖

3) 培地のアンモニウムイオン濃度、硝酸イオン濃度と植物体再生

培地中のアンモニウムイオン濃度と硝酸イオン濃度の比率と本葉発生との関係についての結果を第17図に示した。本葉の発生率は、培地中の硝酸イオン濃度の割



第17図 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>濃度と本葉発生及び不定胚増殖

合が高くなるにしたがって増加し、アンモニウムイオンを全く含まない硝酸ナトリウム1000mg/l添加区で最高値を示した。また、二次胚形成については、前述の試験と同様に本葉発生率とほぼ逆の傾向がみられ、硝酸イオンを含まない硫酸アンモニウム800mg/l区では約60%に達した。

4) 前培養でのABA処理の効果及び再生培地での糖の種類と植物体再生

不定胚を各種の濃度のABAで前処理した後再生培地に移植し、本葉発生、不定胚増殖を調査した結果を第12表及び第13表に示した。本葉発生率は、ABA0.2mg/lの20日処理あるいは0.4mg/lの10日処理で高い値を示し、ABA無添加区では本葉発生は全くみられなかった。また、再生培地でのしよ糖又はマルトースの添加による本葉発生率はしよ糖の方がややましかった。

不定胚増殖のみられた不定胚の割合は、第12表と第13表で大きな差があったが、いずれもABA添加区に比べて無添加区の方が高い値を示した。

第12表 前培養でのABA処理と植物体再生

前培養条件		供試数	本葉発生 %	組織肥大 %	不定胚増殖 %
ABA濃度	処理日数				
0	0	80	0	0	23.8
0.2	10	130		0	0
	20	130	3.1	0	0
0.4	10	130	4.6	0	0
	20	130	0.8	0	0.8
0.8	10	130	0	6.0	0
	20	130	2.3	0	0.8

第13表 前培養でのABA処理、再生培地での糖の種類と植物体再生

前培養 ABA濃度	再生培地 糖の種類	供試数	本葉発生 %	組織肥大 %	不定胚増殖 %
0	しよ糖	50	0	0	46.0
	マルトース	50	0	8.0	34.0
0.2	しよ糖	50	12.0	0	16.0
	マルトース	50	10.0	0	18.0
0.4	しよ糖	50	4.0	0	32.0
	マルトース	50	0	0	18.0
0.8	しよ糖	50	2.0	6.0	20.0
	マルトース	50	0	0	0

注) 前培養は10日間

VI. 不定胚からの再生個体の生育状況

組織培養を大量増殖に利用する場合には、それによって得られる苗に変異個体が発生するかどうか重要な問題となる。メロンにおいては、不定胚を用いた増殖系では変異個体の発生が認められており<sup>3)</sup>、実用化する場合の問題点となっている。そこで、ワサビについても不定胚からの再生個体における変異個体発生の有無を検討した。

1. 実験材料および方法

不定胚から再生した小植物体を利用して1988/1989年と1989/1990年に順化後の生育を調査した。

1988/1989年の試験では、不定胚から再生した小植物体は、植物培養用フラスコを用いてホルモンフリーワサビ用改変MS培地で育成し、葉柄長が約3cmになった苗をパーミキュライトを入れた育苗箱に植え付けて1988年9月7日から順化室で順化した。順化室は、1日に12時間ずつの明期と暗期を設け、明期は5000lxになるように蛍光灯で照明した。また、照明時は23°C、70%、暗黒時は18°C、75%となるように温度と湿度を調節した。苗は約10日間順化処理をした後ガラス室で育苗した。

分割増殖苗は、試験管内(BA0.1mg/lを含んだワサビ用改変MS培地)で維持している‘島根3号’を分割することによって増殖させたものを不定胚再生苗と同様にして育成し、同程度の大きさになったものを1988年9月7日から同様にして順化・育苗したものを利用した。

実生苗については、‘島根3号’の種子を1988年7月15日から約5°Cの冷蔵庫でジベレリン(GA)処理(100mg/lで10日間処理)を行った後、水洗して同条件で8日間の催芽処理を行い、同年8月2日に冷房装置のあるガラス室(昼20~27°C、夜15~23°C)に播種し、9月7日に育苗箱に移植して育成したものを用いた。

これら3種類の苗は1988年10月6日に育苗箱(50cm×36cm×10cm)に1箱当たり10株ずつ定植し、ガラス室(最低温度10°Cに加温)で栽培した。床土は川砂、パーミキュライト、ピートモス、パーライトを5:3:

第14表 不定胚再生苗、分割増殖苗、実生苗の生育比較 (1988/1989)

苗の種類	2月22日調査					5月16日調査				
	調査数	腋芽数	葉数	葉柄長	葉身長	調査数	腋芽数	葉数	葉柄長	葉身長
				cm	cm				cm	cm
不定胚再生苗	16	7.8	27.2	25.0	11.4	8	8.0	34.4	26.0	11.4
分割増殖苗	16	10.0	33.3	23.7	11.2	8	10.4	41.7	25.1	11.2
実生苗	16	4.3	20.8	25.1	13.6	8	4.9	30.9	29.2	12.9

注) 数値は1株当りの平均値

不定胚再生苗と分割増殖苗は実生苗に比べて腋芽の発生数が多く、それに伴って葉数も多かった。1988/1989年の試験では2月と5月の2回調査を行ったが、3種類の苗とも2月と5月で腋芽数に大きな差はなかった。また、葉柄長は、2月の調査では3種類の苗について大きな差はなかったが、5月の調査では実生苗が

1:1の割合で混合したものを用い、肥料としてMS培地の無機成分を10倍に希釈して2週間間隔で育苗箱1箱当たり約1lずつ施用した。調査は1989年2月22日および同年5月16日に行った。第1回目の調査の後で育苗箱当たりの株数が5株になるように間引きを行った。

1989/1990年の試験は前回の試験とほぼ同様の方法で行った。不定胚再生苗および分割増殖苗の順化は1989年10月3日に行い、実生苗の播種は同年の8月8日とした。定植は同年の11月19日とし、調査は1990年4月18日に行った。

調査は、腋芽数、葉数、葉柄長、葉身長、葉身幅について行った。葉柄長、葉身長、葉身幅は各株で大きい順に3枚の葉を調査し、その平均値をもとめた。

2. 実験結果

2か年にわたって行った苗の栽培試験の結果を第14表及び第15表に示した。いずれの試験においても、不

第15表 不定胚再生苗、分割増殖苗、実生苗の生育比較 (1989/1990)

苗の種類	4月18日調査					
	調査数	腋芽数	葉数	葉柄長	葉身長	葉身幅
				cm	cm	cm
不定胚再生苗	13	8.5	34.0	25.0	11.2	11.4
分割増殖苗	14	8.7	31.1	25.7	14.9	14.3
実生苗	30	4.4	18.9	25.6	15.4	14.9

注) 数値は1株当りの平均値

やや大きな値を示した。葉身の大きさを示す葉身長、葉身幅は1988/1989年の試験では実生苗が不定胚再生苗、分割増殖苗に比べて大きかった。また、1989/1990年の試験では分割増殖苗、実生苗が不定胚再生苗に比べて大きかった。このことから、不定胚再生苗は他の種類の苗に比べて葉がやや小さいものと考えられた。

実生苗では、葉柄の色がやや濃い赤紫色を呈するものほとんど赤紫色のみられないものが観察された。これに対して、不定胚再生苗ではやや濃い赤紫色、分割増殖苗ではわずかに赤紫色を帯びており、個体間の差はほとんどみられなかった。葉の形についてはいずれの苗でも個体間の差はほとんどみられず、外観上では実用上問題のある変異は認められなかった。

Ⅶ. 考 察

不定胚を用いた増殖系について西村ら<sup>33)</sup>は、植物の組織上に直接不定胚を誘導させる「直接法」と、組織からいったんカルスを誘導させ、そのカルスから不定胚を誘導する「間接法」の2種類の方法があると述べている。現在、間接法による不定胚形成は、ニンジン、セルリー等のセリ科、ナス、ペチュニア等のナス科、ダイズ、アルファルファ等のマメ科、キュウリ、メロン等のウリ科、イネ、オオムギ等のイネ科など多数の植物で報告されている<sup>33,37)</sup>。この方法は、カルスの段階で増殖率が高く、大量増殖が容易に行える利点がある。しかし、カルスを経由することは、再生個体に変異を発生させる可能性が多いと考えられる。これに対して、直接法では、組織の表面から直接不定胚を形成するため、変異の発生が少ないと推察され、増殖率や植物体再生率が向上すれば極めて有望な増殖法になると考えられる。この報告は、ワサビについて、主として直接法による不定胚の形成法と、その表面での二次胚形成を利用した増殖系を確立し、更に、増殖した不定胚からの植物体再生、再生植物体の生育状況について検討したものである。

ワサビの不定胚は、未熟種子子葉あるいは未熟胚で、その表面から直接誘導されることが明らかとなり、そのための培地は、ホルモンフリーのワサビ用改変MS培地が適切であると考えられた。ホルモンを添加した場合にはカルスが形成され、不定胚とカルスが同時に観察される場合もみられたが、カルスのみを移植した場合に不定胚形成がみられないことから、不定胚は組織表面から直接形成されたものと考えられる。

メロン等多くの植物ではホルモンを添加することにより不定胚が誘導されているものが多いが<sup>33)</sup>、ワサビにおいてはホルモン添加は不定胚誘導に対して阻害的に働く傾向を認めた。不定胚が植物組織から直接形成される場合には、一般的に、植物ホルモンの添加あるいはストレスを与えることが必要であるといわれてい

る<sup>16)</sup>。古川ら<sup>5,6)</sup>、Kiyosueら<sup>22)</sup>はニンジンで高浸透圧や重金属のストレスによって胚の表面に不定胚が形成されることを認めている。ワサビでは、今回の一連の実験によって、ホルモンフリーの条件でも不定胚が誘導されることが明らかとなった。このことは、ワサビにおいては、未熟種子あるいは未熟胚を摘出して培養すること自体がストレスとして作用しているものと推察される。

末松ら<sup>40)</sup>も筆者らと同様に、‘ふじだるま’及び‘真妻’でホルモンフリーあるいはオーキシン、サイトカイニン添加の条件で不定胚が形成されることを認めている。筆者らは、更にホルモンフリーのワサビ用改変MS培地が適し、BAは不定胚形成に対して阻害的に作用することを明らかにした。ホルモンフリーで不定胚が誘導されることについては、Crouch<sup>2)</sup>がナタネで認めており、ワサビと同じアブラナ科に属する点で興味深い。

筆者らは、不定胚が形成される器官が未熟種子あるいは未熟胚の子葉であることを明らかにし、末松ら<sup>40)</sup>も未熟胚に形成されることを示している。ワサビは、現在のところ、固定された品種はなく、圃場から選抜された個体はすべて遺伝的にヘテロである。したがって、その次世代である未熟種子、未熟胚は親とは異なった遺伝子組成をもつことになる。優良個体のクローン増殖を目的とする場合には、古谷ら<sup>7)</sup>の根茎からの誘導法のほかに、更に生長点、葉、茎など優良個体の組織からの不定胚誘導法を検討する必要がある。

薬からの不定胚形成は花弁長/薬長の値が1.5~2.0のつぼみの薬を改変NITSCH培地に置床し、30°C暗黒条件2日間の前処理の後、20°Cで培養することにより可能であることが明らかとなった。Brassica属ではナタネ、ハクサイ等で薬あるいは花粉からの不定胚形成が報告されている<sup>17,35,39)</sup>。また、その再生した個体に半数体が確認されており、形成された不定胚は花粉起源であることが推定されている<sup>8,18,19)</sup>。ワサビの染色体は2n=28であるとされており<sup>21)</sup>、吉田ら<sup>46)</sup>は‘島根3号’が2n=28であることを報告している。今回の実験で再生された個体はいずれも2n=28で半数体は認められなかった。ワサビにおいて薬からの不定胚は薬壁を突き破って発生しており、また、幼根を外側にして薬壁から飛び出した状態で形成されているものもみられた。このことは、形成された不定胚は薬内の遊離した細胞、すなわち花粉起源であることを示唆しており、いずれもその染色体が不定胚形成の過程で自然倍加し



たものであると推察される。

本間ら<sup>15)</sup>は‘真妻’の交雑種の蒔を活性炭を添加したB5培地で培養することによって、不定胚の形成率が向上することを認め、20~50%の形成率を実現している。しかし、筆者らはB5あるいはKELLERの改変B5培地を用いた実験では不定胚の形成は認めていない。これについては、活性炭の効果により、培地の塩類濃度あるいはその他の物質の濃度が変化して、不定胚形成に適した条件になった可能性があると考えられ、培地について更に検討が必要である。また、本間らは35°Cの高温処理でも不定胚形成を認めている。筆者らも、35°Cの高温処理で不定胚が形成された例も経験していることから、高温処理の温度、方法についても更に検討する必要がある。

ワサビでは不定胚の表面で容易に二次胚形成がみられることが明らかとなったが、この現象を利用した大量増殖法については、BHANSOLI<sup>1)</sup>がモモで報告している。また、CROUCH<sup>2)</sup>はBrassica属で未熟胚を培養するとその表面に二次胚形成がみられることを報告している。ワサビはBrassica属とは異なるものの、同じアブラナ科に属していることから、二次胚形成が容易に行われることが理解できる。しかし、Brassica属の場合の二次胚形成は胚軸でみられるのに対して、ワサビでは子葉でみられる点が相違している。

次に、二次胚形成を利用した不定胚の増殖の効率化について検討した。液体培養時に用いる蓋については、サンキャップシートを用いた場合に、ポリ塩化ビニリデンフィルムあるいはポリエチレンフィルムに比べて不定胚の増殖率が高かった。田中は<sup>42)</sup>、ポリ塩化ビニリデンフィルムはガス透過性がほとんどないとし、高澤ら<sup>41)</sup>は、サンキャップシートを利用した場合は、二重に重ねたアルミホイルで閉栓したものに比べて10倍以上の換気回数(単位時間あたりの換気量を培養容器内空気容量で除したもの)をもつことを認め、サンキャップシートは空気の流通が容易であることを明らかにしている。したがって、不定胚の増殖率がサンキャップシートで勝ることから、不定胚の増殖時には多くの酸素が必要であることが示唆される。一方、培地に添加する糖については、しょ糖20g/lで増殖率が最も高く、濃度をそれより増加させた場合には増殖率が大きく低下し、また、グルコースを用いた場合には、20g/lよりも10g/l添加区でしょ糖20g/l添加区に近い増殖率となった。このことは不定胚の増殖に対して培地の浸透圧が影響しており、しょ糖20g/l添加区

の浸透圧が増殖に適していることを示していると考えられる。しょ糖20g/lとグルコース10g/lはともに約0.06Mであり、浸透圧がほぼ等しいことから、培養12日後の増殖率が同程度であったものと考えられる。しかし、24日後の調査ではグルコース10g/l添加区がしょ糖20g/l添加区に比べて増殖率が低くなったが、これはグルコース10g/l添加区はしょ糖添加区に比べて炭素源としての糖の量が少なく、12~24日の間で炭素源が不足したことが原因と考えられる。培地の窒素成分については、窒素源としてグルタミンを添加した場合に不定胚の増殖率が向上することが明らかとなった。また、グルタミンを添加したAA培地で培養中の窒素成分の変化をみると、培養初期にグルタミンの吸収量が多く、これに対して硝酸イオン、アンモニウムイオンは培養7日後以降になってから利用され始めることが明らかとなった。ワサビ用改変MS培地では、培養7日までは硝酸イオン、アンモニウムイオンの吸収は少なく、その後吸収量が大きく増加した。このように、培養の初期段階から窒素成分を多量に吸収利用できるためAA培地では不定胚増殖率が高くなるものと考えられる。一般に、植物に吸収された硝酸イオンは、亜硝酸イオンに還元された後アンモニウムイオンに還元され、更にグルタミン合成酵素によって細胞内のグルタミン酸に取り込まれグルタミンが合成されて利用されているといわれている<sup>38)</sup>。イネの不定胚ではグルタミン合成酵素の活性が低く、グルタミンなどのアミノ酸添加が不定胚形成を促進することが知られている<sup>14,20)</sup>。したがって、ワサビの不定胚においても、イネと同様にグルタミン添加により増殖が促進されることから、グルタミン合成酵素の活性が低い可能性が考えられる。

不定胚の増殖率については、サンキャップシートを蓋に用いて酸素を多量に供給し、グルタミンを添加することによって、半月で重量が約19倍、これから計算すると1か月間で約300倍以上に増殖することが明らかとなった。また、不定胚細断片を1か月間培養した結果では1gから160~450個の不定胚が得られている。従来の試験管内分割増殖法<sup>45)</sup>では1か月で2~3倍の増殖率であるのに比べて、二次胚形成を利用した増殖法は、極めて有利な方法であるといえよう。また、この増殖法は液体培地を用いるため、培地の交換が容易で試験管内分割増殖法に比較して労力を大幅に削減することができる。したがって、不定胚からの植物体再生さえ確実にできれば有効な増殖法になるものと考えられる。

えられる。

不定胚からの植物体再生率は、ABA処理で向上する例が知られており<sup>16)</sup>、ナタネでもABA処理により発芽率が向上したことが報告されている<sup>17)</sup>。ワサビにおいてもABA処理による再生率の向上がみられたが、不定胚からの植物体の再生は極めて低率で、10%前後の再生率を示す場合が多かった。しかし、糖の種類とGA添加の効果を検討した実験(第16図)では他の実験に比べて高い再生率を示し、マルトース及びGA添加区で約37%の再生率が得られた。今後、再生条件について更に検討する必要がある。

植物体に再生しない不定胚はその表面で二次胚形成がみられるものが多く、植物体再生率とほぼ逆の傾向を示した。このことは、不定胚からの植物体再生と不定胚表面での二次胚形成は相反する現象であることを示唆しており、二次胚形成に適した条件は不定胚からの植物体再生を妨げているものと考えられる。ワサビでは、ホルモンフリー条件において未熟種子の表面で二次胚形成が観察される。このように容易に二次胚形成のおこる植物では、逆に不定胚からの植物体再生が困難であるものと考えられる。種子中の胚は、その発生過程で二次胚形成はみられず、すべて正常な発生を経て種子が形成される。これに対して、摘出した未熟胚は、*in vitro*で培養した場合にはその表面に不定胚が形成される。このことは、不定胚表面への二次胚形成は本来正常な発生過程ではなく、生理的に異常な状態で起こる現象であり、植物体再生を阻害するものと考えられる。このため、不定胚の二次胚形成を利用した増殖は、結果的に二次胚形成という異常な発生をする細胞塊を選抜することになり、継代を重ねるにしたがって植物体再生が困難になっていくものと推察される。今後、*in vitro*と*in vivo*の両方で胚の発生過程を物理的、生理的な両面から比較することによって、不定胚が正常な発生過程を経て植物体再生に至る方向と、二次胚形成により増殖する方向のどちらに向かうかを決定する要因を解明することができると考えられる。そして、不定胚の再生、増殖が制御できるようになれば、不定胚の二次胚形成を利用した増殖法は実用可能なものとなる。

不定胚から再生した個体を順化後、約6か月間育苗箱で栽培して生育状況を見ると、実生苗に比べて不定胚再生苗、分割増殖苗は腋芽数が多いことが明らかとなった。腋芽数は定植4か月後の調査ですでに明らかで、その後はいずれの苗でもほとんど増

加していない。このことから、定植時あるいはその直後には、外観上腋芽の存在が確認できないものの、葉腋にはすでに腋芽の原基が存在しており、その後の腋芽数が決定されているものと考えられる。これが遺伝的な形質によるものか、あるいは培養による影響かを明らかにするためには、それぞれの苗を株分けにより増殖し、その後の生育を調査する必要がある。

また、葉の形、葉柄の色については不定胚再生苗、分割増殖苗ともに個体間の差は少なく、外観上では実用上問題となる変異のないことを認めた。メロンについては、不定胚から再生した個体では、多くの個体で染色体数の変異が発生し、次代に遺伝する場合のあることが確認されている<sup>3)</sup>。この違いは、メロンがカルスを経由した増殖系であるのに対してワサビではカルスを経由しないことによるものと考えられる。ワサビは現在のところ、育種はあまり進んでおらず、栽培されている品種でも変異個体を含めて栽培されていると考えられる。また、品質についても他の作物のような厳密性は求められない。したがって、変異が発生した場合でも、その許容範囲はこれらの作物に比べて広いといえよう。その点からも、ワサビは不定胚などによるクローン増殖技術を利用しやすい作物であると判断される。

現在ワサビの栽培には多くの品種が利用されているが、その中で‘島根3号’は、実生繁殖可能な品種として、病害対策などから実生栽培が行われている。ワサビの種子は乾燥に弱いため、湿った砂に埋めて貯蔵されているが、貯蔵中に腐敗することが多い。低温あるいは凍結貯蔵法も研究されているが<sup>30,31)</sup>、実用化に至っていない。今回の成果が実用化できれば、‘島根3号’の未熟種子から得られた不定胚を実験室内で不定胚増殖系を用いて維持しておき、必要なときに必要な数だけ不定胚を増殖し、生産者に安定して苗を供給することが可能となろう。更に、不定胚を人工種子としてワサビ生産農家に供給する方法も開発できるものと考えられる。

## VIII. 摘 要

ワサビにおける不定胚形成、不定胚の増殖、不定胚からの植物体再生について検討した。

### 1. 種子からの不定胚形成

1) 不定胚は未熟種子の子葉切片及び未熟胚から誘導することができた。不定胚は、ホルモンフリーのワ

サビ用改変MS培地 (MS培地のNH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>とKNO<sub>3</sub>の濃度を1/2にしたものにしよ糖20g/lを添加し, 2g/lジェランガムで固化した培地) で高頻度に発生した。また, BAと2,4-Dを添加した培地ではカルスが発生した。

2) 形成された不定胚をホルモンフリーのワサビ用改変MS培地に移植したところ, 一部の不定胚から植物体が再生した。また, 多くの不定胚ではその表面で二次胚形成がみられた。

## 2. 薬からの不定胚形成

1) 不定胚形成は, 0.1mg/lNAA+0.1mg/l2,4-Dあるいは0.1mg/lNAA+0.1mg/l2,4-D+0.02mg/lBAを添加した改変NITSCH培地(NITSCH多量要素+B5微量要素+MSFe+NITSCHビタミン+800mg/lL-グルタミン+100mg/lL-セリン+100g/lしよ糖を0.8%寒天で固化したものでみられた。その場合, 不定胚形成には30°Cで2~3日間の高温処理が必要であった。不定胚形成に適した薬のステージは, 花弁長/葯長の値が1.0~2.0のものであった。

2) 形成された不定胚をホルモンフリー改変MS培地に移植したところ, 約20%の不定胚が植物体に再生した。再生した個体は草勢が弱かった。染色体数を調査したところいずれの個体も二倍体(2n=28)であった。

## 3. 不定胚の増殖

1) 不定胚の二次胚形成を利用した増殖が可能となった。不定胚は, ワサビ用改変MS培地を50ml入れた100ml三角フラスコを用い, サンキャップシートで蓋をして液体振とう培養をすると高率で増殖することが明らかとなった。また, 培地の窒素成分の代わりに5mMグルタミンと10mMNH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>を添加すると増殖率が向上した。

## 4. 植物体再生

1) 不定胚あるいは二次胚形成によって得られた不定胚の塊からの植物体再生率は, ABAを添加することによって10%前後になった。不定胚形成を大量増殖に利用するためにはさらに再生率を向上させる必要がある。

2) 不定胚あるいは試験管内で分割したシュートから得られた個体は実生個体に比べて腋芽数が多かった。また, 実生個体では葉柄の色に変異がみられたが, 不定胚から得られた個体では色の変異, 形態的な変異はみられなかった。

## 引用文献

- 1) BHANSALI, R. Raj (1990): Rapid multiplication of adventitious somatic embryos in peach and nectarine by secondary embryogenesis. *Plant Cell Reports* 9: 280-284.
- 2) CROUCH, M. L. (1982): Non-zygotic embryos of *Brassica napus* L. contain embryo-specific storage proteins. *Planta* 156: 520-524.
- 3) 江面 浩・雨ヶ谷洋・吉岡啓子・大澤勝次 (1992): 不定胚培養系による四倍体メロンの効率的な作出. *育種*42 (1): 137-144.
- 4) 藤森基弘: ワサビ. 農業技術大系(野菜編11) 特産野菜地方品種. 農文協, p.663-p.677.
- 5) 古川 一・松原千尋・重松典宏 (1989): 植物生長調節剤を用いないニンジンの不定胚形成. *植物組織培養* 6 (2): 92-94.
- 6) 古川 一・重松典宏 (1991): 植物生長調節物質を含まない培地におけるニンジン分果からの不定胚形成の品種間差異. *植物組織培養* 8 (2): 94-97.
- 7) 古谷 力・折原 裕・高木さつき・吉田淑子 (1988): ワサビ培養組織の分化と香味成分. *植物組織培養* 5 (2): 82-86.
- 8) HAMAOKA, Y., Y. FUJITA and S. Iwai (1991): Number of Chloroplasts in Haploids and Diploids Produced via Anther Culture in *Brassica campestris*. *Plant Tissue Culture Letters* 8 (2): 67-72.
- 9) 半田 高・原田 宏 (1992): 高等植物の組織培養—その現状と課題—. *生物環境調節*30 (2): 53-58.
- 10) 春木和久・山田員人・松本敏一 (1988): 組織培養によるワサビの不定胚形成と植物体再生. *近畿中国農研*75: 66-70.
- 11) 堀 秀隆 (1986): ワサビ苗の試験管内大量増殖法. *植物バイオテクノロジー現代化学増刊* 5: 118-123.
- 12) 細木高志・角田美和・浜田守彦・瀬尾光弘 (1986): ワサビの組織培養による増殖. *農および園*61: 995-996.
- 13) 細木高志・白石一剛・岩井元康・稲葉久仁雄 (1988): ワサビの組織培養苗の増殖. *農および園*63: 653-654.
- 14) 東 克己・鎌田 博・原田 宏 (1991): ニンジン

不定胚形成における還元型窒素の影響とGS活性の経時変化について. 第12回植物組織培養学会・シンポジウム講演要旨集; 51.

- 15) 本間義之・馬場不二夫・戸田幹彦 (1991): ワサビ葯からの不定胚形成の向上. *育種*41 (別冊2): 278-279.
- 16) 鎌田 博・原田 宏 (1992): 不定胚形成の分子制御. *蛋白質核酸酵素*37 (7): 1257-1265.
- 17) 河名敬和・大川安信 (1992): ナタネ花粉由来胚からの効率的再分化法. *育種*42 (別冊1): 70-71.
- 18) KELLER, W.A., T. RAIHATHY and J. LACAPRA (1975): In Vitro Production Of Plants From Pollen In *Brassica Campestris*. *Can. J. Genet. Cytol.* 17: 655-666.
- 19) KELLER, W.A. and K. C. ARMSTRONG (1978): High Frequency Production of Microspore-derived Plants from *Brassica napus* Anther Cultures. *Z. Pflanzenzuchtg.* 80: 100-108.
- 20) 喜久田嘉郎・西 太郎・徐 正君 (1991): イネカルスの再分化能と硝酸還元酵素活性. 第12回植物組織培養学会・シンポジウム講演要旨集; 202.
- 21) 北村二郎・村田 源 (1976): 原色日本植物図鑑(中) 保育社 p.176.
- 22) KIYOSUE, T., H. KAMADA, and H. HARADA (1989): Induction of Somatic Embryogenesis from Carrot Seeds by Hypochlorite Treatment. *Plant Tissue Cult. Lett.*, 6: 138-143.
- 23) KURATA, N., T. OMURA, and N. IWATA (1981): Studies on Centromere Chromomere and Nucleolous in Pachytene Nuclei of Rice *Oryza sativa* Microsporocytes. *Cytologia*, 46: 791-800.
- 24) 倉田のり (1985): 染色体解析と遺伝子マッピング. *遺伝*, 39 (7) 15-20.
- 25) 桑野和民・酒巻千波・三田村敏男 (1987): HPLCによるアミノ酸の高速分析—PITCによるプレカラム誘導体化の利用—. *農芸化学会誌*61 (1): 53-55.
- 26) 松本悦夫 (1989): 葯培養による植物体再生. *バイオホルティ* 2. 誠文堂新光社, p.14-16.
- 27) 松本 理・山本雄慈 (1987): ワサビの花茎及び根茎組織の培養による試験管内大量増殖. *近畿中国農研*73: 22-27.
- 28) 湊 莞爾 (1989): 'オレンジクイン'の育成経過と特性. *バイオホルティ* 2. 誠文堂新光社 p.17-19.
- 29) MURASHIGE, T., and F. SKOOG (1962): A Revised

Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.

- 30) 中村俊一郎・Peramachi Sathiyamoorthy (1990): ワサビ種子の貯蔵に関する研究. *園学*59 (3): 579-587.
- 31) 中野敬之・本間義之・戸田幹彦・星谷佳功・石川雅也 (1989): ワサビ乾燥種子の発芽と凍結貯蔵. *育種*, 39 (別冊1): 168-169.
- 32) 西村繁夫 (1990): 培養苗生産システム. 日本植物培養学会第2回植物組織培養コロキウム—組織培養の植物科学・産業技術への利用—; 14-17.
- 33) 西村繁夫・斉藤猛雄・山口真美子 (1990): 不定胚形成の現状と誘導技術. *バイオホルティ* 5 誠文堂新光社, p.9-15.
- 34) NITSCH, J. (1969): Experimental androgenesis in *Nicotiana*. *Phytomorphology* 19: 389-404.
- 35) 大澤勝次 (1986): 野菜の葯培養の現状と実用性. *育種学最近の進歩* 第12回日本育種学会シンポジウム報告 日本育種学会編, p.19-32.
- 36) 大塚寿夫 (1988): わさびの増殖法. *農および園*63: 185-189.
- 37) 大山勝夫 (1990): 細胞育種の現状と展望. 培養苗生産システム. 日本植物培養学会第2回植物組織培養コロキウム—組織培養の植物科学・産業技術への利用—; 6-9.
- 38) 榎原 均・鈴木石根・杉山達夫 (1992): 窒素による植物遺伝子の発現制御. *蛋白質核酸酵素*37 (7): 1214-1221.
- 39) SATO, T., T. NISHINO, and M. HIRAI (1989): Varietal Differences in Embryogenic Ability in Anther Culture of Chinese Cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*). *Japan. J. Breed.* 39 (2): 147-157.
- 40) 末松信彦・本間義之・戸田幹彦 (1987): ワサビ子葉からの不定胚形成. *園芸学会東海支部発表要旨*: 7.
- 41) 高澤明子・古在豊樹 (1992): 培養器, 支持材の種類がカーネーション培養小植物体の正調に及ぼす影響. *生物環境調節* 30 (2): 65-70.
- 42) 田中道男 (1989): フィルム培養容器—カルチャーパッカー—. *バイオホルティ* 2 誠文堂新光社, p.114-116.
- 43) 上野良一・中川善紀 (1973): ワサビの新品種「さ

- んべ」, 「さぶみ」, 「いわみ」について. 島根農試研報 11: 31-40.
- 44) 山田康之・大山莞爾: 植物バイオ工学細胞育種技術実験法. サイエンスフォーラム, p.45.
- 45) 山田真人・春木和久 (1992): ワサビの茎頂培養による大量増殖法. 島根農試研報 26: 85-95.
- 46) 吉田正温 (1974): ワサビ属の細胞学的研究IIワビ: 島根3号. 島根大学農学部研究報告 8: 49-5

### Summary

Several experiments on somatic embryogenesis, propagation of the embryos and plant regeneration Japanese horseradish (*Wasabia japonica* MATSUM.) were carried out.

1. Somatic embryos were induced on cotyledons of immature seeds or immature embryos. Embryogene occurred at a high frequency on the hormon free modified MS medium (MS medium reduced to 1/2  $\text{NH}_4\text{N}$  and  $\text{KNO}_3$ , supplemented with 20g/l sucrose and solidified by 2g/l gellan gum). Calli were formed on t modified MS medium containing BA and 2,4-D. When the induced embryos were removed on the hormon free modified MS medium, a few plantlets were regenerated and secondary embryogenesis were observed the plated somatic embryos.

2. Embryos induction from anthers was obserbed on the modified Nitsch medium (Nitsch macro-nutrients B5 micro-nutrients + MS Fe + Nitsch vitamins + 800mg/l L-glutamine + 100mg/l L-serine + 100g, sucrose) containing 0.1mg/l NAA + 0.1mg/l 2,4-D or 0.1mg/l NAA + 0.1mg/l 2,4-D + 0.02mg/l BA a solidified by 0.8g/l agar. In the case, 2 or 3 days preincubation at 30°C was necessary to induced the formati of embryos. The fit stage for embryos induction was when length ratio of petal/anther reached from 1.0 2.0. When the induced embryos were cultured on the hormon free modified MS medium, about 20% of the were regenerated to plants. The regenerated plants were slow in growth and slight. The analysis of t regenerated plants chromosomes revealed that they were diploid ( $2n=28$ ).

3. Propagation of embryos were possible by secondary embryos formation. Embryos proliferated at a hi rate by shaking liquid culture in a 100ml Erlenmeyer flask containning 50ml hormon free modified MS medi and capped with film attached with a microporous filter. The rate of proliferation was increased by additi of 5mM glutamin, 10mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  and 9.4mM KCl in place of nitrogen components of medium.

4. The friequency of the plantlet formation from somatic embryos or embryo clusters formed by seconda embryogenesis were about 10% when ABA was added. In order to apply the embryogenesis to me propagation, it is necessary to increase the friequency of the plant regeneration.

5. The plants derived from embryos or devided shoots in test tubes exceeded the seedlings in the number axillary buds. Color variations were observed in the petiole of seedlings, but color or morphological variatio were not obserbed in the plants derived from embryos.