

セリ(Oenanthe javanica DC.) の in vitro培養体根組織からの不定胚誘導による増殖

誌名	生物環境調節
ISSN	05824087
著者名	古谷,博 細木,高志
発行元	日本生物環境調節研究会
巻/号	42巻4号
掲載ページ	p. 315-321
発行年月	2004年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



セリ (*Oenanthe javanica* DC.) の *in vitro* 培養体 根組織からの不定胚誘導による増殖

古谷 博^{1,3}・細木 高志^{2,3}

¹ 広島県立農業技術センター

² 島根大学生物資源科学部

³ 鳥取大学大学院連合農学研究科

Micropropagation of *Oenanthe javanica* DC.
by Somatic Embryogenesis from Root Segments of *In Vitro* Culture

Hiroshi FURUYA^{1,3} and Takashi HOSOKI^{2,3}

¹ Hiroshima Prefectural Agriculture Research Center, Higashihiroshima, Hiroshima 739-0151, Japan

² Faculty of Life and Environmental Science, Shimane University, Matsue, Shimane 690-8504, Japan

³ United Graduate School of Agricultural Sciences, Tottori University, Koyama, Tottori 680-0945, Japan

(Received May 13, 2004)

An efficient micropropagation system using the root culture were established in *Oenanthe javanica* DC. In the shoot tip culture, the tip portion of terminal bud or lateral bud was excised and cultured on the half strength Murashige and Skoog medium supplemented with 0.1 mg/L α -naphthalene acetic acid (NAA) or combination of 0.2 mg/L NAA and 0.2 mg/L 6-benzyladenine (BA) under continuous light of 45 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at 25°C. In root segment culture, root explants which were whole roots excised approximately 1.5 cm length from aseptically generated plantlets were used and cultured on MS medium supplemented with 0.05, 0.1 or 1 mg/L 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) and 0, 0.01 or 0.1 mg/L BA at 25°C in the dark. Embryogenic calli were induced on medium supplemented with 0.1 mg/L 2,4-D and 0, 0.01 or 0.1 mg/L BA. Plant regeneration was successful on the MS hormone-free medium. Many embryos were developed into normal plants by subculture on the same medium. *In vitro* propagation with root and petiole sections of aseptically generated plants *in vitro* is more efficient than conventional shoot division *ex vitro*. The results indicate that the micropropagation procedure can be applied to an efficient propagation of *Oenanthe javanica* DC.

Keywords: *in vitro*, micropropagation, *Oenanthe javanica*, somatic embryogenesis, tissue culture

2004年5月13日受付

緒 言

組織培養による増殖法には茎頂培養法、不定芽・不定根誘導法、不定胚誘導法などがある (Takayanagi, 1988; Kamata and Harada, 1989) が、その中でも不

定胚誘導法は、他の培養法と比較して増殖効率が高く、生産プロセスの自動化およびスケールアップがしやすい点で優れ、急速大量種苗生産への応用が期待されており、これまでに200種以上の植物種で不定胚形成の誘導が報告されている (Nishimura et al., 1990; Shimazu and Kurata, 2002)。不定胚誘導による種苗生産

を行う場合には、培養手法の簡易化、効率化、安定化、省力化および低コスト化が問題となる。また、増殖効率を高めるためには継代培養が考えられるが、長期間の培養は外植体の再分化能の低下とともに再生個体の培養変異の発生が問題となり、好ましくない(Kamata and Harada, 1989)。

一方、組織切片から再生した *in vitro* 幼植物体は無菌であり、順化可能な大きさに生育した培養苗の根組織からは、安定して確実にしかも簡単に多数の細根切片が得られる。そこで、この細根切片を外植体に用いた大量増殖体系を確立すれば、計画的な種苗生産が可能になると考える。

著者らは、先にタラノキとアシタバの培養体由来根組織からの不定芽、不定胚形成および植物体再生について報告した (Furuya and Hosoki, 2004a, b)。ここでは、Steward et al. (1958) の報告以来、不定胚形成のモデルとして用いられてきたニンジンと同じセリ科のセリ (*Oenanthe javanica* DC.) について、莖頂培養による再生植物体の根組織切片からの不定胚誘導および植物体再生について検討した結果、大量増殖系が確立できたので報告する。

材料および方法

1. 莖頂培養

東広島市内に自生するセリ野生株の若い伸長茎を採取し、水洗後、70%エタノールに数秒と有効塩素 0.5%の次亜塩素酸ナトリウム溶液に 15 分間浸漬して振盪殺菌した後に、滅菌水で 3 回洗浄したものを供試した。頂芽および側芽の莖頂を、0.5 mm の大きさに顕微鏡下で摘出して培地に置床した。培地は、Murashige and Skoog (1962) 培地 (MS) の無機成分を 1/2 倍濃度に希釈したもの (1/2 MS) を基本に用い、3%ショ糖と植

物生長調節物質を添加した後、pH 5.7 に調整し、0.8%寒天を加えて溶解したものを培養容器 (高さ 90 mm, 径 20 mm 試験管) に分注 (培地量 6 ml) し、オートクレーブで滅菌 (1.2 kg cm^{-2} , 121°C , 15 分間) して作製した。

試験は、 α -naphthaleneacetic acid (NAA) と 6-benzyladenine (BA) を用いて、Table 1 に示した 7 区を設け、1 区当たり 28~30 個の莖頂を供試して行った。培養は、 25°C , $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 16 時間照明下 (白色蛍光ランプ: FL40SW, 三菱電機オスラム (株) 製) で行った。莖頂置床 1 カ月後に、莖頂の生存数、カルス形成数、シュート伸長数、発根数を調査し、供試数に対する割合を算出した。

2. 根組織切片培養

莖頂培養 (1 の実験の 0.1 mg/L NAA 添加区) により作出した再生植物を、植物生長調節物質を添加しない MS 培地 (フリー培地) で 30 日間継代培養を行い養成した培養幼植物体を供試した。長さ 3~5 cm に伸長した根組織を約 1.5 cm の長さに切断し、その細根切片を外植体として用いた。培地は、MS を基本に用い、3%ショ糖と植物生長調節物質を添加した後、pH 5.7 に調整し、0.8%寒天を加えて溶解したものを培養容器 (高さ 100 mm, 径 25 mm 試験管) に分注 (培地量 10 ml) し、1 の実験と同様に作製した。

試験区は、植物生長調節物質の 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D: 0.05, 0.1, 1 mg/L) と BA (0, 0.01, 0.1 mg/L) を組み合わせる添加した 9 区、および 2,4-D, BA とも添加しない区を設けて試験した。試験は、培養容器当たり外植体 3 個を置床し、試験区当たり 30 容器 (外植体計 90 個) を供試して行った。外植体置床後は 25°C , 暗黒下で培養を行い、30 日後に外植体から形成したカルスを同一容器のフリー培地へ移植した。

Table 1 Effect of the plant growth regulators on plantlet regeneration from shoot tip segments of *O. javanica*.^z

NAA (mg/L)	BA (mg/L)	Number of explants tested	% of explants survived	% of explants formed calli	% of explants formed shoots	% of shoots rooted	Numbers of roots per shoot
0.1	0	29	79.3	26.1	75.9	65.5	8.5 ± 0.9 ^y
0.1	0.1	29	75.9	75.9	27.6	6.9	1.5 ± 0.5
0.1	1	28	100.0	100.0	0	0	—
0.2	0.2	30	86.7	16.7	86.7	80.0	10.2 ± 1.0
1	0	30	80.0	30.0	0	0	—
1	0.1	28	82.1	82.1	0	0	—
1	1	28	100.0	96.4	0	0	—

^z Data were taken after 30 days of shoot tip culture.

^y Mean ± SE.

フリー培地へ移植後は、1の実験と同様の条件下で60日間継代培養した。

外植体置床30日後に、カルス形成数を調査し、フリー培地移植60日後にカルスからの不定胚形成数と幼植物体再生数を調査し、それぞれ供試数に対する割合で表した。

3. *in vitro* 増殖

2の実験において、根組織切片を外植体に用い、0.1 mg/L 2,4-D 添加培地で誘導した不定胚をフリー培地に移植後に得た再生植物の葉柄(長さ約1 cm)および根組織切片(長さ約1.5 cm)を、それぞれ外植体として供試した。

試験区は、MS培地を基本に0, 0.05 および0.1 mg/L 2,4-D 添加の3区を設け、3%ショ糖と0.8%寒天を加えて溶解した後、培養容器(高さ100 mm, 径25 mm 試験管)当たり10 mlを注入し、1の実験と同様に作製した。

試験は、容器当たり外植体2個、試験区当たり10容器(外植体計20個)を供試して行った。外植体置床後の培養条件は、2の実験と同様に行った。

外植体置床30日後に外植体からのカルス、不定芽および不定胚形成数を調査した後、フリー培地に移植し、30日間継代培養後にカルスからの不定胚形成数と幼植物体再生数を調査し、それぞれの供試数に対する割合で表した。

結果および考察

1. 茎頂培養

茎頂を置床し、1カ月間培養後の生存率は、いずれの試験区とも75.9%以上と高かった。カルス形成率は、0.1 mg/L NAA と0.1~1 mg/L BA 併用添加区および1 mg/L NAA と0.1~1 mg/L BA 併用添加区が75.9~100%と高く、0.1~1 mg/L NAA 添加区および0.2 mg/L NAA と0.2 mg/L BA 併用添加区は16.7~30.0%と低かった。茎頂からのシュート伸長率は、0.2 mg/L NAA と0.2 mg/L BA 併用添加区が86.7%と高く、0.1 mg/L NAA 添加区は75.9%であった。0.1 mg/L NAA と0.1 mg/L BA 併用添加区では27.6%と劣った。なお、0.1 mg/L NAA と1 mg/L BA 併用添加区および1 mg/L NAA と0~1 mg/L BA 併用添加区では、シュートの形成はまったく認められなかった。伸長したシュートからの発根は、0.2 mg/L NAA と0.2 mg/L BA 併用添加区は80%、0.1 mg/L NAA 添加区は65.5%認められた。なお、両区のシュート当たりの発根数は

10.2~8.5本であった(Table 1)。

ウイルスフリーを目的に行う生長点培養では、培地に添加する植物生長調節物質は低濃度のオーキシン単独あるいは低濃度のサイトカイニンとを組み合わせて添加した培地が用いられる。一方、増殖を目的とした茎頂培養では、茎頂の頂芽優勢を崩し、茎頂組織に存在する側芽(腋芽)を伸長させるために、サイトカイニンを用いるのが一般的である(Saito, 1990)。本実験におけるセリの茎頂からのシュート伸長は、0.1 mg/L NAA 添加培地で75.9%認められたが、サイトカイニンのBAを0.1 mg/L 併用添加区では、シュートの伸長率は低下した。また、0.2 mg/L NAA と0.2 mg/L BA 併用添加区では、0.1 mg/L NAA 添加区よりもシュートの伸長率および発根率は向上した。このことから、今後サイトカイニンの種類と濃度についてさらに検討を行えば、シュート伸長率および発根率の向上が図られると思われる。

なお、本実験において、0.1 mg/L NAA 添加区または0.2 mg/L NAA と0.2 mg/L BA 併用添加区で得られた再生植物の根組織は細根切片を得るのに十分な大きさに生育したことから、上記培地条件は、根組織切片培養に供試する外植体を得る方法として適するものと判断した。

2. 根組織切片培養

茎頂培養により得た再生植物の、根組織切片からの不定胚誘導および植物体再生に及ぼす2,4-DとBAの影響について検討した。その結果、根組織切片からのカルス形成率はいずれの試験区とも80~100%と高かった(Table 2)。形成したカルスの形状は、外植体

Table 2 Effect of 2,4-D and BA on callus formation from root segments excised from plantlets *in vitro* of *O. javanica*.²

2,4-D (mg/L)	BA (mg/L)	% of segments formed callus
0	0	0
0.05	0	80.0
0.05	0.01	80.0
0.05	0.1	80.0
0.1	0	86.7
0.1	0.01	96.7
0.1	0.1	100.0
1	0	93.3
1	0.01	90.0
1	0.1	83.3

² Data were taken after 30 days of culture.

の表面に盛り上がり、柔らかく黒ずんだ灰色の小粒の塊であった。

次に、フリー培地へ移植したカルスからは、新しく黄色のカルスが形成した。このカルスは、根組織切片から形成したカルスとは色や形態が異なり、このカルスを不定胚が形成しやすいカルス、すなわち embryogenic callus (EC) と判断した (Fig. 1)。その後、増殖したカルスからは多くの不定胚または不定胚様個体が形成し、生育して幼植物体となることが認められた (Fig. 2)。なお、厳密に不定胚と判断するには、組織切片を作製し、顕微鏡による形態観察の証明が必要である。

EC 誘導による不定胚の形成率は、初代培養時の 2,4-D 添加濃度により異なり、0.1 mg/L 添加区は

63.3~76.7%と高く、0.05 mg/L 添加区は 20~40%で、1 mg/L 区は 0~26.7%であった。2,4-D と BA の併用添加区では、2,4-D の濃度が 0.05~0.1 mg/L 区では BA 併用添加の有無による不定胚形成率に大差はみられなかった。しかし、2,4-D 1.0 mg/L 添加区での BA 併用添加は、不定胚形成を抑制した。1 外植体から形成したカルスおよび不定胚を含めた培養体の生育 (生体重) は、2,4-D 添加培地間では 0.05 mg/L 区と 0.1 mg/L 区の間には大差はなかったが、1.0 mg/L 区は劣った。フリー培地に移植した培養体は、不定胚から発育した幼植物体 (Fig. 3) が認められ、継代培養を続けると多数の再生植物に生育した (Fig. 4)。外植体当たりの再生



Fig. 1 Callus formation from root segments of *O. javanica*. Embryogenic callus (arrow) were formed from root segments on modified solid MS medium supplemented with 0.1 mg/L 2,4-D. Bar: 1 cm.

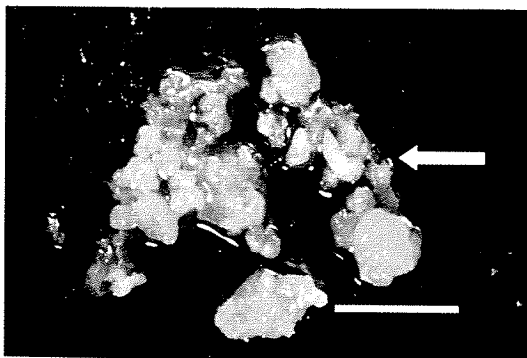


Fig. 2 Embryo formation from root segments of *O. javanica*. Somatic embryo (arrow) were formed on the calli when transferred to hormone-free medium from the calli. Bar: 1 cm.

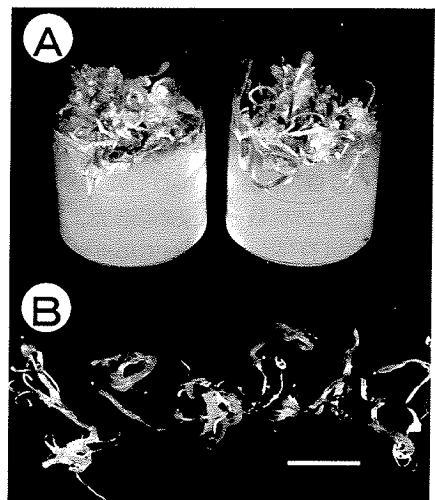


Fig. 3 Growth and development of somatic embryos on hormone-free MS medium in subculture. A: somatic embryos. B: plantlets developed from somatic embryos. Bar: 1 cm.



Fig. 4 Acclimated plants obtained by root segment culture. Bar: 1 cm.

Table 3 Effect of 2,4-D and BA on somatic embryo formation and plant regeneration from root segments excised from plantlets derived from shoot tip culture of *O. javanica*.^z

2,4-D (mg/L)	BA (mg/L)	% of segments formed somatic embryos ^z	Fresh weight of plantlets developed from somatic embryos (mg) ^{zy}	Number of regenerated plants per explant
0	0	0	—	—
0.05	0	23.3	489±159 ^x	10.1±3.7 ^x
0.05	0.01	40.0	386±61	5.3±1.5
0.05	0.1	20.0	653±136	10.2±1.4
0.1	0	63.3	658±51	12.6±1.4
0.1	0.01	63.3	617±109	13.7±2.4
0.1	0.1	76.7	688±65	10.4±0.7
1	0	26.7	383±51	6.8±1.9
1	0.01	10.0	140±16	5.0±0.6
1	0.1	0	—	—

^z Data were taken after 30 days of subculture without plant growth regulators.

^y Callus, somatic embryos and regenerated plants.

^x Mean±SE.

植物体数は、0.1 mg/L 2,4-D 添加区および 0.1 mg/L 2,4-D と 0.01 mg/L BA 併用添加区が 12.6~13.7 本と多かった (Table 3)。

セリの不定胚誘導に関しては、すでに以下の報告がある。Endo and Shoji (1994) は、展開第 1~2 葉の葉柄から 0.1 mg/L 2,4-D 添加培地で EC を誘導している。Lee and Lee (1993) および Kim and Lee (1995) は、小花から 1 mg/L 2,4-D 添加液体培地で EC を誘導している。これらの報告では、2,4-D と BA の併用添加ではカルスは増殖するが、EC の形成は抑制されている。本実験においては、BA の添加濃度が 0.01~0.1 mg/L と低いために、併用添加の影響はみられなかったものと思われる。ウコギ科のウドでは、葉切片および未成熟種子からの不定胚誘導の報告があり、Noguchi (1997) は、葉切片から 0.5 mg/L 2,4-D 添加 1/2 MS 培地でカルスを誘導し、そのカルスを 2,4-D を含まない培地で継代培養して不定胚を誘導している。Nishihira et al. (1998) も、葉片および未成熟種子から 0.5~1 mg/L 2,4-D 添加 MS 培地で誘導したカルスから、100% の不定胚形成を得ている。これらの報告では、外植体から不定胚を誘導するには、いずれも 2,4-D 添加培地がい用いられており、その添加濃度は、植物および外植体の種類と培養方法により異なっている。本実験では、外植体からの不定胚形成は 0.1 mg/L 2,4-D 添加培地で認められ、1 mg/L 2,4-D 添加培地でカルスは高率に形成されるが不定胚の形成は劣り、上記の報告とは異なる結果であった。このことから、セリの根組織からの不定胚形成のホルモン要求量は少ないものと考えら

れた。

なお、茎頂培養において、BA、NAA 添加培地では茎頂からのカルス形成は高率に認められたが、再生植物は得られなかった。NAA のかわりに 2,4-D を用いて、BA との併用添加培地で茎頂培養を行ってカルス形成を図り、形成したカルスをフリー培地に移植して継代培養すれば、EC が誘導できるかもしれない。しかし、*in vitro* 培養幼植物体の根組織切片は取り扱いが容易であることから、外植体として適している。また、培養苗の順化時に組織切片の一部を利用して再度培養すれば、種苗の計画的安定供給が可能となるので、効率的な増殖法であると考えられる。

3. *in vitro* 増殖

根組織切片から得た *in vitro* 再生植物を供試し、その葉柄および根組織切片を外植体として用いて、再度培養を行った。その結果、葉柄および根組織切片からのカルス形成は、2,4-D 無添加区は 0% であったが、2,4-D 添加区では、葉柄切片は 75~90%、根組織切片は 100% であった。なお、2,4-D 無添加区では葉柄切片で 10%、根組織切片で 5% の外植体から直接シュートの形成が認められた。

2,4-D 添加培地に置床した根組織切片は、外植体置床 30 日後には、45~65% の外植体にカルス経由の不定胚が認められた。不定胚の色は黄色で、カルスの表面から突起し、盛り上がった状態に形成していた。2,4-D 添加培地で形成したカルスをフリー培地に移植し、継代培養を行うと、30 日後にはほとんどの外植体から再生植物が得られた。すなわち、葉柄切片では、2,4-D 添

Table 4 Effect of the 2,4-D on plantlet regeneration from leaf stalk and root segments of *O. javanica*.

Explants	2,4-D concentrations (mg/L)	% of segments formed callus ^z	% of segments formed shoots ^z	% of segments formed somatic embryos ^y	% of segments formed plantlets ^y	Number of regenerated plant per explant ^x
Leaf stalk segments	0	0	10	0	10	3.7
	0.05	75	0	0	80	33.3 ± 1.9 ^x
	0.1	90	0	0	90	29.4 ± 2.6
Root segments	0	0	5	0	5	12.5
	0.05	100	0	45	100	40.9 ± 5.3
	0.1	100	0	65	100	42.0 ± 4.1

^z Data were taken after 30 days of culture.

^y Data were taken after 30 days of subculture without plant growth regulators.

^x Mean ± SE.

加培地上ではカルスからの不定胚形成はみられなかったが、カルスをフリー培地に移植して継代培養すると不定胚が誘導でき、80~90%の外植体から再生植物が得られた。外植体当たりの幼植物体数は、葉柄切片が29.4~33.3、根組織切片は40.9~42.0で、培養部位では根組織切片のほうが多い傾向にあった。なお、2,4-Dの添加濃度について、0.05 mg/L区と0.1 mg/L区の間にはほとんど差はなかった (Table 4)。

Iritani et al. (1980) は、セリ科のニンジン根肥大部の形成層を含む柔組織からのカルス誘導および器官形成には、 10^{-5} M NAA が効果的であると報告している。また、Furukawa et al. (1989) は、ニンジンの無菌植物の幼根から植物ホルモンを用いることなく不定胚を形成することを認め、Wetherell (1984) は、浸透圧のストレスによってニンジンの不定胚形成が高まることを報告している。本実験では、根組織切片から再生した培養幼植物体の葉柄および根組織切片を再度外植体として用いて培養した結果、外植体から多数の再生植物が安定して得られた。

このことから、セリの *in vitro* 培養体の組織切片からの不定胚誘導には2,4-Dが適していることが確認できた。これは、培養体の組織は若いので、細胞分裂や植物体を再生する能力 (再分化能) が高いためと考えられる。

野菜における不定胚誘導の培養材料には、細胞分裂の盛んな茎頂、実生、若い葉、未熟胚および胚軸などが用いられている (Tabei, 1990)。また、実生の根組織からの不定胚誘導の報告は、ニンジン (Iritani et al., 1980)、*Brassica napus* (Lazzeri and Dunwell, 1984)、ホウレンソウ (Komai et al., 1996) などで見られるが、*in vitro* 培養体の根組織切片を用いた不定胚誘導の報

告例は少ない。ハマボウフウの種子胚を無菌培養により発育させて得た実生の各種組織片を外植体として培養した結果、葉柄および根組織は子葉組織および種子胚組織よりカルス形成率が高いことを報告している (Hirai et al., 1995)。本実験でも、根および葉柄組織からの植物体再生は容易であり、根組織は葉柄組織よりもカルス形成率および不定胚形成率が高かったことから、培養幼植物体の根組織は再分化能の高い細胞であることが推察される。

次に、不定胚誘導による大量増殖を図るためには、誘導した EC の維持・増殖のための培養条件の検討が必要である (Nishimura et al., 1990)。セリでは、小花から誘導した EC の維持・増殖には2,4-D 0.5 mg/L 添加培地が適するという報告 (Kim and Lee, 1995; Yong and Lee, 2000) があるが、本実験では検討しなかった。その理由は、*in vitro* 培養体の根組織切片からの不定胚誘導法は、他の組織部位に比べて効率的であるからである。すなわち、簡単な操作で無菌の大量切片が容易にしかも安定して得られることから、計画生産という点では非常に実用的な増殖法である。

なお、再生植物は、バーミキュライトで順化後、市販の育苗用土を用いてポット植えて順調に生育することを認めた。今後、本手法がセリの周年栽培、水耕栽培などの新タイプへ活用されることを期待し、得られた再生植物について簡易な順化法を検討するとともに、セル成型育苗法についての検討が必要である。また、外植体の採取部位の違いや、葉柄・根組織切片を繰り返し培養に供した際の形態的・遺伝的変異についても調査する必要があり、今後の課題である。

摘 要

セリの *in vitro* 培養体の根組織切片を利用した効率的な種苗増殖体系の確立を目的に試験した。

in vitro 培養体を得るため、頂芽または側芽の茎頂を、1/2 MS(3%ショ糖)に NAA 0.1 mg/L と BA 0~0.1 mg/L 添加または NAA 0.2 mg/L と BA 0.2 mg/L 添加した寒天培地に置床し、25°C、45 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、16 時間照明下で培養した。次に、再生植物の根組織切片を、MS 培地 (3%ショ糖) に 2,4-D 0.05~1.0 mg/L と BA 0~0.1 mg/L を添加した寒天培地に置床して、25°C、暗黒条件下で培養すると、カルスが形成した。形成したカルスをフリー培地に移植すると EC が誘導され、その後、不定胚が形成した。不定胚は、フリー培地で継代培養すれば幼根および幼芽は発育し、完全な再生植物体となった。

根組織切片から得た再生植物の葉柄および根組織切片を外植体に用い、再度同様の条件下で培養を繰り返せば、外植体から効率的に再生植物が得られた。この方法は、従来の株分け繁殖に比べ、非常に効率的な増殖法である。

文 献

- Endo, K., Shoji, K. 1994. Somatic embryogenesis of *Oenanthe stolonifera*, *Apium graveolens* and *Angerica utilis*. (Japanese text with English abstract) Bull. Miyagi Prefect. Agric. Res. Cent. **60**: 65-75.
- Furukawa, H., Matsubara, C., Shigematsu, N. 1989. Somatic embryogenesis in carrot without plant growth regulators. Plant Tissue Culture Letters **6**: 92-94.
- Furuya, H., Hosoki, T. 2004a. Adventitious shoot formation, somatic embryogenesis and plantlet regeneration from *in vitro*-cultured root tissue of Japanese Angelica tree (*Aralia elata* S.). (Japanese text with English abstract) Hortic. Res. (Japan) **3**: 355-360.
- Furuya, H., Hosoki, T. 2004b. Adventitious shoot formation, somatic embryogenesis and plantlet regeneration from *in vitro*-cultured root tissue of asitaba (*Angelica eiskei* (Miq.) Koidz.). (Japanese text with English abstract) Hortic. Res. (Japan) **3**: 361-366.
- Hirai, G., Kasai, N., Harada, T. 1995. Callus formation and somatic embryogenesis in tissue culture of *Glehnia littoralis* Fr. Schm. J. Jpn. Soc. Hortic. Sci. **64** (Suppl. 2): 278-279 (Japanese text).
- Iritani, M., Harada, T., Yakuwa, T. 1980. Basic studies on the vegetative propagation of horticultural plants. III. Callus and organ formation in the *in vitro* culture of tissue segments derived from carrot plant. (Japanese text with English abstract) Memoirs Fac. Agric. Hokkaido Univ. **12**: 281-291.
- Kamata, H., Harada, H. 1989. Cell, tissue and organ culture (細胞, 組織, 器官培養). In "Plant Tissue Culture (植物細胞組織培養)." (ed. by Harada, H., Komamine, A.) (Japanese text) Rikougakusha, Tokyo, p 65-104.
- Kim, H. S., Lee, B. Y. 1995. *In vitro* production system of Somatic embryos in *Oenanthe stolonifera* DC. J. Korean Soc. Hortic. Sci. **36**: 38-45.
- Komai, F., Okuse, I., Harada, T. 1996. Effective combinations of plant growth regulators for somatic embryogenesis from spinach root segments. J. Jpn. Soc. Hortic. Sci. **65**: 559-564.
- Lazzeri, P. A., Dunwell, J. M. 1984. *In vitro* shoot regeneration from seeding root segments of *Brassica napus* cultivars. Ann. Bot. **54**: 341-350.
- Lee, J. W., Lee, B. Y. 1993. Development of mass production systems by somatic embryogenesis in *Oenanthe stolonifera* DC. I. The induction and morphological characteristics of somatic embryogenesis. J. Korean Soc. Hortic. Sci. **34**: 108-114.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. **15**: 473-497.
- Nishihira, T., Hayashi, Y., Matsumoto, K. 1998. Somatic embryogenesis from leaf disks and immature seeds of *Aralia cordata* Thunb. (Japanese text with English abstract) J. Jpn. Soc. Hortic. Sci. **67**: 81-86.
- Nishimura, S., Saito, T., Yamaguchi, M. 1990. The present condition of embryogenesis and the induction technics (不定胚形成の現状と誘導技術). In "Farming and Gardening (extra issue) (農耕と園芸別冊), Bio Hortic. 5: Embryogenesis and Mass Propagation (バイオホルテイ 5: 不定胚誘導と大量増殖)." (Japanese text) Seibundo Shinkousha (誠文堂新光社), Tokyo, p 9-15.
- Noguchi, T. 1997. An efficient somatic embryogenesis in Udo (*Aralia cordata* Thunb.). (Japanese text with English abstract) Bull. Tokyo Agric. Res. Cent. **27**: 1-8.
- Saito, T. 1990. Methods of shoot tip culture (茎頂培養法). In "Compendium of the New Biotechnology 2: Tissue and Cell Culture for Vegetables Propagation (最新バイオテクノロジー全書 2: 野菜の組織・細胞培養と増殖)." (Japanese text) Nogyotosho (農業図書), Tokyo, p 41-48.
- Shimazu, T., Kurata, K. 2002. Large-scale transplant production by somatic embryo culture and its environmental control. (Japanese text with English abstract) Environ. Control in Biol. **40**: 133-146.
- Steward, F. C., Mapes, M. O., Mears, K. 1958. Growth and organized development of culture cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. Am. J. Bot. **45**: 705-708.
- Tabei, Y. 1990. Methods of embryogenesis (不定胚誘導). In "Compendium of the New Biotechnology 2: Tissue and Cell Culture for Vegetables Propagation (最新バイオテクノロジー全書 2: 野菜の組織・細胞培養と増殖)." (Japanese text) Nogyotosho (農業図書), Tokyo, p 60-64.
- Takayanagi, K. 1988. Manuals of Practical Tissue Culture of Vegetables (実用野菜組織培養マニュアル). (Japanese text) Japan Seed and Seedling Association (日本種苗協会), Tokyo, p 1-12.
- Wetherell, D. F. 1984. Enhanced adventive embryogenesis resulting from plasmolysis of cultured wild carrot cells. Plant Cell, Tissue Organ Culture **3**: 221-227.
- Yong, N. G., Lee, B. Y. 2000. *In vitro* mass production of somatic embryos and anatomical study in *Oenanthe stolonifera* DC. J. Korean Soc. Hortic. Sci. **41**: 569-575.