

고추냉이의 未熟胚培養으로부터 體細胞胚 發生과 植物體 再分化

殷鍾旋* · 高正愛 · 金榮善¹ · 金明準

全北大學校 園藝學科, ¹全北大學校 農村社會發展研究所

Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Immature Zygotic Embryo Culture of *Wasabia japonica* Matsum.

Jong Seon EUN*, Jeong Ae KO, Young Seon KIM¹, and Myung Jun KIM

Department of Horticulture, Chonbuk National University; and ¹Institute of Rural Development, Chonbuk National University, Chonju, 560-756. *Corresponding author.

Immature zygotic embryos from immature seeds of *Wasabia japonica* (cv Dalma) were isolated and cultured on modified MS medium supplemented with 2,4-D, IAA, and BA. Immature zygotic embryos were classified into torpedo shape and cotyledonary stage. The highest rates of callus formation were obtained on 1.0 mg/L IAA (torpedo stage, 90.0%) and 1.0 mg/L 2,4-D plus 0.1 mg/L BA (cotyledonary stage, 84.3%). Somatic embryos were most effective on medium devoid of growth regulators or with 1.0 mg/L IAA, and began to differentiate directly from the surface of cotyledons of zygotic embryos after 14 days of culture. They were proliferated into numerous somatic embryos after 60 days of culture. These numerous somatic embryos could be separated and subcultured on the same media for further propagation. After 90 days of culture, most somatic embryos were developed well organized embryos which were able to produce into whole plants.

Key words: embryogenic callus, somatic embryos, torpedo shape.

일본이 원산지인 고추냉이는 십자화과에 속하는 반음지성 다년생 속근성 식물로서 향신료로 이용되며 주로 냉량한 산간부에서 재배되는 고급채소이다. 우리나라에서 흔히 와사비라고 불리우고 있는데 재배되는 환경조건에 따라 일본에서는 물와사비와 발와사비로 구분하며 물와사비는 根莖을 이용하고 발와사비는 주로 와사비漬의 가공원료로 이용되고 있다(大塚, 1988).

우리나라에서의 고추냉이 소비량은 매년 증가하고 있는데 대부분 屬名이 전혀 다른 서양 와사비를 캐나다에서 수입하여 가공하고 있으며 특급호텔에서 사용하는 극히 소량은 일본에서 高價에 수입하고 있는 실정이다. 울릉도에도 고추냉이가 자생하고 있지만 경제성이 없으며 최근 전북 무주군 덕유산 일대 해발 400-600 m의 산간고냉지에서는 일본에서 수입한 종자를 실험재배하고 있는데 새로운 농가 고소득작물로서 관심의 대상이 되고 있다. 그러나 특수한 병해 및 재배기술 애로와 판로 등 많은 문제가 도출되고 있는 바 품종개발, 증식 및 재배체계확립 등에 보다 적극적인 연구가 필요하다.

일반적으로 고추냉이는 잡종성이 강하여 채종한 후 實生 苗를 육성하면 여러 가지 형질이 다른 변이체가 나타나므로 交雜種의 우량한 성질을 유지할 수 없고, 전형적인 발아 저해성 종자로서 건조에 약하고 또한 저온습윤저장을 하여도 休眠이 알아짐에 따라 萌芽가 많아지는 문제가 있기 때문에 그 발아 및 저장에 대한 문제점을 해결하기 위한 실험이 실시되었다(Nakamura and Sathiyamoorthy, 1990).

따라서, 번식은 주로 우수한 품종의 우량형질을 유지하기 위해 영양번식을 이용하고 있는데 이것 또한 증식률이 낮고 種苗 확보가 어려우며 軟腐病, 墨入病, 바이러스병 등의 피해로 품종의 퇴화 및 우량계통 보급에 여러 가지 문제가 있다(鈴木, 1976). 또한 냉량한 산간부에서만 재배가 국한되어 있어 어느 지역이나 재배하기에는 耐暑性이 문제점으로 되어 내서성계통을 선발하기 위한 연구도 행해지고 있다(細木 等, 1988).

고추냉이의 실생묘 재배 및 영양번식상의 문제점을 해결하기 위한 노력으로 조직배양을 이용한 우량계통의 대량증식이 연구되고 있는데, 莖頂이나 花莖의 액아에서 재생한

小植物體를 시험관내에서 증식하는 방법의 개발로 幼植物體의 급속증식을 시도한 바 있고(細木等, 1986; 大塚, 1988), 未熟胚 및 종자의 子葉으로부터 體細胞胚를 유도하는 일련의 실험결과가 보고되었다(春木, 1991). 본 실험에서는 고추냉이의 조직배양에 의한 다량증식을 기하고자 성장조절제의 조성을 달리한 배지에 미숙배를 배양하여 캘러스, 體細胞胚 및 식물체 재분화에 미치는 성장조절제의 효과와 未熟胚의 배양적기를 조사하였다.

材料 및 方法

재료는 전북 무주군 설천면 해발 450 m 내외의 개인농장에서 재배중인 고추냉이(*Wasabia japonica* Matsum.) 품종 "달마"의 未熟胚를 길이 3-4 mm인 魚雷型 胚(Stage I)와 5-7 mm인 子葉期 胚(Stage II)로 구분하여 치상하였다. 배지는 MS (Murashige and Skoog, 1962) 기본배지에서 NH_4NO_3 와 KNO_3 의 농도를 1/2로 감량하고 2,4-D, IAA, BA를 Table 2와 같이 조성하여 20 g/L sucrose를 첨가하고 pH 5.8이 되도록 조절하였으며, Gelrite 0.2%를 첨가한 후 121°C의 고압멸균기에서 15분간 멸균하여 사용하였다.

치상재료는 미숙한 꼬투리를 70% ethanol에 4-5초간 침지한 후 7% calcium hypochlorite 수용액에 10분간 소독하고 멸균수로 4-5회 수세한 다음 미숙종자로부터 未熟胚를 꺼내어 직경 90 mm의 무균 petri-dish에 10개씩 치상하였다. 배양조건은 20°C에서 암배양하였고 캘러스, 胚發生 및 식물체 再分化에 미치는 성장조절제의 효과를 배양 1주일 후부터 조사하였으며 발생된 體細胞胚와 shoot는 동일배지에 계대배양하였다.

結果 및 考察

어뢰형의 未熟胚를 배양한 결과 성장조절제 처리에 따라 캘러스, 胚發生에 많은 차이를 보였는데(Table 1), 1.0 mg/L 2,4-D 처리구에서는 치상체의 36.4%에서 캘러스만 발생되었을 뿐 배발생 및 胚軸과 뿌리가 신장되는 발아현상은 보이지 않았고 나머지는 모두 치상당시와 같은 모습이거나 고사되었다. 또한 1.0 mg/L 2,4-D에 0.1 mg/L BA가 첨가된 경우에는 캘러스가 형성되지 않고 置床 당시와 같은 상태로 전혀 반응을 보이지 않아 쏘 처리구 중에서 가장 不良한 결과를 보였다. 그러나 1.0 mg/L IAA 첨가구에서는 치상당시의 魚雷型 상태에서 약간 子葉이 전개되기 시작하였는데 이 자엽으로부터 90%의 개체에서 캘러스가 발생되어 캘러스 발생율이 가장 양호하였으며 일부 캘러스로부터 胚發生이 동시에 시작되었다(Fig. 1A). 또한 1.0 mg/L IAA와 1.0 mg/L BA를 혼용처리한 결과 캘러스 발생은 IAA 단

독처리구에 비해 현저히 낮았으나 배발생은 약간 상승되었고 몇몇 치상체에서는 뿌리가 분화되는 것을 관찰할 수 있었다.

한편, 성장조절제가 전혀 첨가되지 않은 경우 배양 2주일 후부터 未熟胚들은 발아, 신장되어 캘러스가 유도되면서 역시 배발생도 시작되었는데 한개의 미숙배에서 전개된 자엽으로부터 많은 수의 體細胞胚가 직접 형성되어 성장조절제가 첨가된 처리구보다 가장 양호한 배발생을 보였다.

Table 1. Various responses from immature embryo of torpedo stage (Stage I) culture of *W. japonica* cultured on modified MS medium supplemented with growth regulators after 90 days of culture.^a

Treatment (mg/L)	No. of immature embryos					Plant regeneration frequency ^{b,c}		
	2,4-D	IAA	BA	cultured	producing calus		producing embryo	germinating
0	0	0	20	6(30.0)	11(55.0)	6(30.0)	3(15.0)	++
1.0			22	8(36.4)	-	-	-	+
1.0		0.1	21	-	-	-	-	-
		1.0	20	18(90.0)	5(31.3)	-	-	++
		1.0	24	13(54.2)	9(37.5)	1(4.2)	4(16.7)	+++

^aNumbers in parentheses indicate percentage to number of explants cultured.

^bThis frequency indicates plant regenerated from somatic embryo and organogenic callus.

^c+: slight (5-30%), ++: moderate (31-70%), +++: good (71-100%).

기관분화성 캘러스와 발생된 체세포배는 식물체로 재분화시키기 위해 동일배지에 계대배양하였는데 1.0 mg/L IAA와 0.1 mg/L BA 혼용처리구에서 가장 빠른 성장속도를 나타냈다.

어뢰형 胚보다 10일정도 더 성숙한 자엽기의 未熟胚는 종피속에서 자엽이 약 3 mm 정도 신장된 상태였는데 이들 미숙배를 꺼내 어뢰형 胚와 반응정도를 비교하기 위하여 같은 배지에 치상하였다(Table 2). 성장조절제가 첨가된 경우 전 처리구에서 캘러스 발생은 65% 이상을 나타내었으나 胚發生은 성장조절제 처리구에 따라 현저히 다른 반응을 보였다. 2,4-D 1.0 mg/L 첨가구의 경우 30%가량이 치상당시보다 胚軸이 약간 신장되었으며 뿌리분화는 관찰되지 않은 상태에서 주로 子葉에서 75.3%의 캘러스가 발생되고 배발생은 31.2%를 보였는데(Fig. 1B), 이것은 어뢰형상태의 미숙배의 경우 캘러스만 발생되고 배발생은 전혀 이루어지지 않은채 치상체의 절반이상이 치상당시의 모습으로 배양 30일까지 변화가 없었던 점에 비해 훨씬 양호한 결과였다. 1.0 mg/L 2,4-D에 0.1 mg/L BA를 혼용첨가한 경우 캘러스 발생은 성장조절제 처리구중에서 가장 양호한 결과로 84.3%였으나 그에 비해 胚發生은 7.8%로 가장 저조하였다. 2,4-D 단용처리구에서는 캘러스발생이 비교적 양호하고 배축이

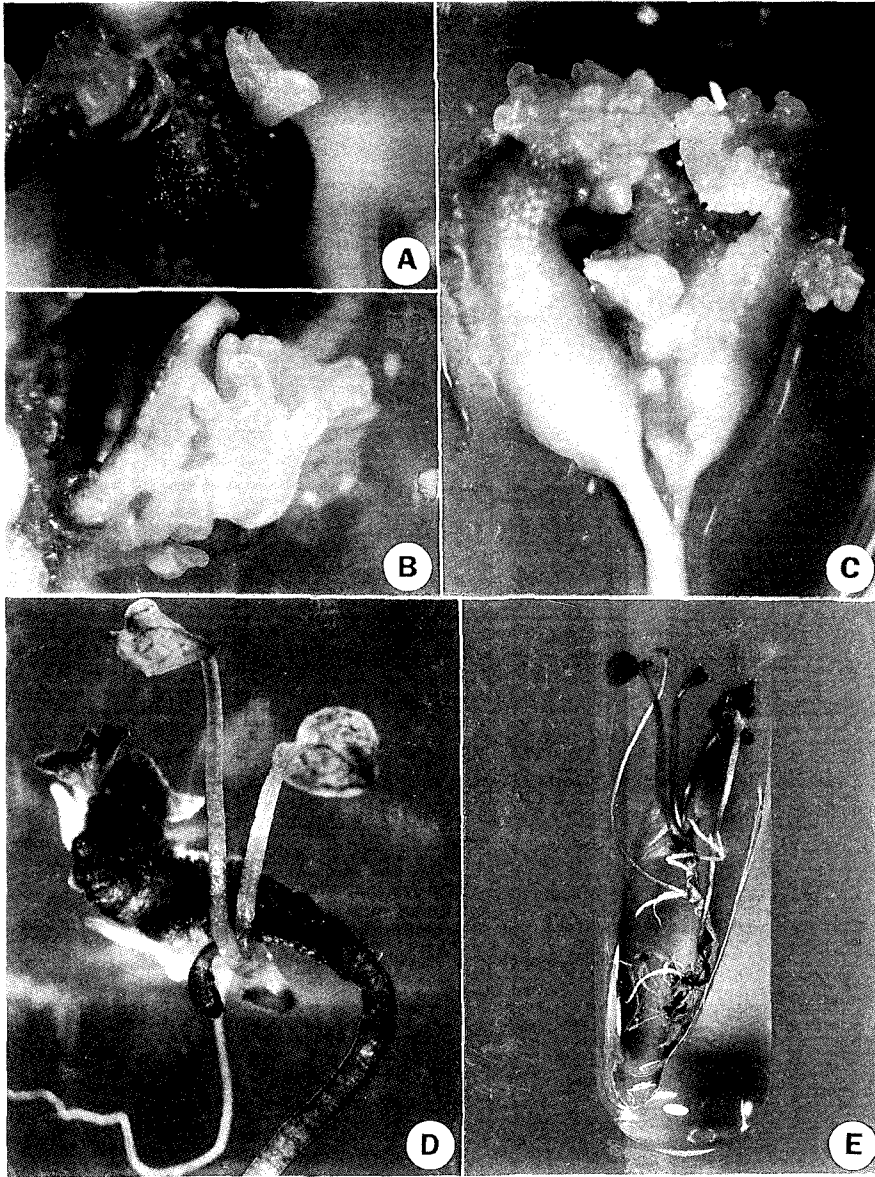


Figure 1. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration of immature zygotic embryo culture in *W. japonica*. A and B: direct somatic embryos differentiated from cotyledon on modified MS medium with 1.0 mg/L IAA in stage I (A) and II (B) of immature zygotic embryo, C: embryogenic callus and somatic embryo derived from callus on the medium with 1.0 mg/L IAA in the cotyledon of stage II, D: plantlet regeneration from somatic embryo on the medium without growth regulator in stage II, and E: A plantlet subcultured on the basal medium.

伸長되는 체세포배도 상당수 관찰되었으나 뿌리는 발생되지 않았으며, BA를 혼용처리 했을 경우는 배축신장은 없이 몇몇 치상체에서 약간의 뿌리발생이 관찰되었다. 동일한 배지에서의 캘러스 발생은 魚雷型 胚와 비교하면 자엽이 전개된 어느 정도 성숙한 미숙배가 良好하다는 것을 알 수 있었다.

IAA 1.0 mg/L 단독처리한 경우 배축이 신장되면서 뿌리발생이 가장 많이 나타났는데 자엽에서 배양 1주일 후부터 胚發生: 캘러스가 유도된 후 배양 20일 경에는 캘러스로부터 胚가 유도되거나 자엽표면에서 백색의 소돌기가 직접 발생되어 70.9%의 가장 양호한 胚發生率을 보였다(Fig. 1C). 1.0 mg/L IAA에 0.1 mg/L BA가 혼용처리된 배지에서는 치상체의 80% 이상이 胚軸과 뿌리가 길게 신장하여 대부분이 발아되었는데 다른 처리구와 마찬가지로 주로 자엽에서 캘

러스가 발생되었고 어뢰형 胚에 비하면 胚發生은 저조하였다.

한편, 성장조절제가 전혀 첨가되지 않은 배지의 경우 캘러스 발생은 성장조절제 처리구에 비하여 가장 낮은 39.2%를 보였으나 胚發生은 58.3%로 1.0 mg/L IAA 처리구 보다 좋은 결과를 보였고 발아신장은 80% 이상을 보여 (Fig. 1D) 1.0 mg/L IAA에 0.1 mg/L BA를 혼용처리한 배지와 같은 수준으로 나타났다.

이상의 결과에서 어뢰형 胚와 자엽단계의 未熟胚 培養을 비교하면 캘러스와 體細胞胚는 어느 경우나 자엽에서 주로 발생하였는데 어뢰형 胚는 배양후 1주일 정도는 자엽전개가 이루어졌고 자엽이 어느 정도 성숙한 다음 자엽에서 캘러스나 胚發生이 관찰되었다. 반면에 치상당시 자엽이 전개된 상태의 未熟胚는 캘러스나 배발생이 어뢰형 胚보다 빨

Table 2. Various responses from immature embryo with cotyledon developed (Stage II) culture of *W. japonica* cultured on modified MS medium supplemented with growth regulators after 90 days of culture^a.

Treatment (mg/L)			No. of immature embryos					Plant regeneration frequency ^{b, c}
2,4-D	IAA	BA	cultured	producing calus	producing embryo	germinating	rooting	
0	0	0	120	47(39.2)	70(58.3)	98(81.7)	31(25.8)	+++
1.0			93	70(75.3)	29(31.2)	28(30.1)	-	+
1.0		0.1	115	97(84.3)	9(7.8)	-	11(9.6)	+
	1.0		127	83(65.4)	90(70.9)	43(33.9)	50(39.4)	+++
	1.0	0.1	99	71(71.7)	10(10.1)	80(80.8)	29(29.3)	++

^aNumbers in parentheses indicate percentage to number of explants cultured.

^bThis frequency indicates plant regenerated from somatic embryo and organogenic callus.

^c+: slight (5-30%), ++: moderate (31-70%), +++: good (71-100%).

리 시작되었고 몇몇 처리구에서는 胚軸에서도 체세포배를 관찰할 수 있었지만 대부분 자엽 표피에서 형성되어 너무 어린 미숙배보다 약간 성숙된 未熟胚培養이 캘러스 및 체세포배 발생에 양호하였다.

또한 발생된 캘러스는 기관분화성 캘러스와 胚發生的 캘러스로 유도되었고 器官分化는 대부분 캘러스를 통하여 shoot가 분화되었고 자엽조직에서 직접 분화되는 것은 관찰되지 않았으며 胚發生과 혼재되어 나타났다.

발생된 體細胞胚와 shoot는 동일배지에서 계대배양하였을 때 생장조절제 무처리구에서 가장 정상적인 식물체로 발육되었으며(Fig. 1E), 1.0 mg/L IAA 처리구에서도 식물체 재분화율은 양호한 편이었으나 신장률은 무처리구에 비해 느린 편이었다.

生長調節劑 처리효과는 무처리구와 비교하였을 때 월등하게 양호한 결과를 보이지 않았는데 이것은 고추냉이의 자엽조직이 이미 胚形成能을 보유하고 있기 때문에 배양이라는 환경조건만 갖추어 주어도 생장조절제와 상관없이 캘러스 및 배발생이 이루어졌다고 생각된다. 그러나 본 실험의 처리구 중 1.0 mg/L IAA 단용처리구가 胚發生이 가장 양호한 점으로 볼 때 더 많은 캘러스나 體細胞胚를 얻기 위해서는 적당한 생장조절제의 종류와 농도를 처리하는 것이 효과적으로 나타났다.

고추냉이를 증식시키기 위하여 엽병기부의 腋芽를 신장시켜 分株하는 방법이 관행적으로 실시되고 있는데 우량계통이 선발되어도 그 이후의 증식속도가 느리기 때문에 조직배양에 의한 영양계의 대량증식을 위한 방법으로 주로 頂端分裂組織培養을 하여 왔다. 細木等(1986)은 1-2 mm의 정단분열조직을 적출하여 MS배지의 주요 鹽類와 RN배지의 미량요소 및 비타민을 첨가한 기본배지에 0.1 mg/L

BA를 첨가하여 莖頂의 생장과 分枝를 촉진시켰다. 배양 111일째에 3分割될 수 있는 크기로 생장되었고 다시 이것을 생장점을 포함한 측지의 기부를 자르거나 主莖을 중단하여 다시 배양하였을 때 분할된 개체는 배양 35일경에 4분할할 수 있는 개체로 생장되어 1本の 親株에서 수십本の 側枝를 가진 경정을 얻을 수 있었다.

또한 엽원기 2-3 매를 포함한 莖頂組織을 약 0.5 mm로 잘라 MS 배지에 2.0 mg/L IAA가 첨가된 배지에서 배양하였을 때 60-80%의 莖葉分化率을 나타냈고, IAA 첨가배지에서는 發根이 빠르고 생육도 양호하여 치상 3개월 후에는 분지가 생장된 개체를 얻을 수 있었다(大塚, 1988).

松本과 山本(1986)은 화경조직과 根莖組織을 배양하였던 바 花莖葉 착생 기부에 있는 側花房의 미발달한 엽맥부를 약 5 mm의 길이로 절단하여 LS 배지에 NAA와 BA를 첨가한 배지에서 小植物體를 얻을 수 있었는데 화경하위의 미발달 화방에서 양호한 결과였다고 하였다.

이와 같이 정단분열조직이나 花莖의 액아에서 재생된 소식물체를 계속적인 분할에 의해 증식시키는 방법이 개발되어 실용화되고 있으나 이 방법은 시험관내에서 小植物體를 꺼내 다시 시험관에 이식하는 조작을 반복해야하는 등 많은 노력이 소요된다.

따라서 효율적인 증식법으로 식물체의 각 부위를 재료로 하여 캘러스 유도, 부정아 및 부정배 유도에 대한 실험이 실시되었다(大塚, 1988). 葉柄의 경우 MS + 2.0 mg/L IAA, MS + 2.0 mg/L IAA + 2.0 mg/L BA에서 최고 50%까지 캘러스를 유도하였으나 얻어진 캘러스는 그 증식이 어려웠고, 葉柄이외에 葉片이나 莖頂組織을 이용하였을 경우에도 캘러스로부터 莖葉의 분화는 없었다고 하였다. 또한 藥培養에서 화학유래의 캘러스가 2,4-D와 BA 혼용처리에서 가장 많이 유도되었고 캘러스로부터 겨우 1개체의 식물체 재분화가 있었다고 하였다. 이러한 결과에서 보면 고추냉이의 캘러스 형성과 캘러스로부터 식물체 재분화는 가능하지만 형성된 캘러스의 증식과 再分化能에는 상당한 문제점으로 나타났다.

이와 같이 캘러스증식과 재분화에 대한 문제점을 해결하기 위한 방법으로 어린 未熟胚의 자엽으로부터 배발생 과정을 거쳐 식물체를 재분화시켰다는 보고가 있는데(末松等, 1987), 미숙배는 치상 후 바로 고사하는 경우가 많았으며 치상 약 1개월 후에 子葉의 표면에 체세포배를 형성하는 것이 관찰되었고 이 體細胞胚는 자엽에서 직접 발생하는 것이 대부분이었지만 캘러스로부터 형성되는 경우도 있었다고 하여 본 실험과 같은 결과였다.

또한 고추냉이의 체세포배 유도를 위하여 완속증자와 미속증자의 子葉, 魚雷型 단계의 未熟胚를 이용한 실험결과에서 완속증자에서는 체세포배 형성이 없었지만 미속증자의 자엽에서는 생장조절제 무처리구와 IAA 단용처리구에서 체세포배를 관찰할 수 있었고, 미숙배의 경우 캘러스가 형성

된 2,4-D와 BA의 혼용처리구 이외의 1.0 mg/L IAA와 2,4-D 단용처리구, 1.0 mg/L IAA + 0.1 mg/L BA, 성장조절제 무처리구 모두에서 배발생이 이루어져 가장 좋은 결과를 보였다(春木, 1991). 이것은 본 실험의 미숙배를 배양하여 자엽으로부터 캘러스 및 胚發生을 통하여 정상적인 식물체 재분화가 가능하였던 점과 일치하였는데 본 실험에서는 미숙배를 발육단계별로 구분하였던 바 너무 어린 어뢰형 胚보다는 약간 성숙한 자엽단계의 미숙배가 식물체 재분화에는 더 양호한 것으로 나타났다.

이와 같이 미숙한 接合子胚를 배양하였을 때 체세포배는 發芽하고 있는 접합자성 胚의 자과 배축으로부터 직접 발생되거나 캘러스를 통해 배발생의 일반적인 단계를 거쳐 식물체 재분화가 이루어지는데 성장조절제 처리에 따라 미숙배 배양은 여러 가지 반응을 나타낸다. *Camellia japonica* (Vieitez and Barciela, 1990)의 경우 2.0 mg/L BA처리구에서는 未熟胚가 정상적으로 발아하였고 성장조절제 무처리구는 정상 發芽는 전혀 없이 비정상적인 발아를 보였고 0.5 mg/L BA + 1.0 mg/L IBA 처리구에서는 미숙배의 자엽으로부터 체세포배가 형성되었다고 하였다. 또한 접합자 배의 크기는 2-5 mm 보다 6-9 mm가 양호하다고 하여 치상당시의 접합자배의 크기도 체세포배 발생에 영향을 미친다고 하였다.

Helianthus annuus (Wilcox McCann et al., 1988)에서도 미숙배를 배양하였을 때 자엽에서 체세포배를 형성하였고, *Calotropis gigantea* (Roy and De, 1990)의 미숙배를 배양하여 1.0 mg/L 2,4-D에서 cotyledonary node에서 캘러스가 발생하고, 5.0 mg/L NAA에서 뿌리 발생, 0.1 mg/L NAA + 2.0 mg/L BA 처리구에서 shoot가 再分化되었다고 하였다.

본 연구에서는 성장조절제 무처리구와 1.0 mg/L IAA 단독처리구에서 주로 정상적인 식물체로 발아 신장되었고 體細胞胚는 주로 신장되지 않은 자엽에서 발생되었으며 胚軸에서는 거의 관찰되지 않았다. 또한 미숙배의 크기는 5 - 7 mm의 약간 자엽이 전개된 미숙배에서 모든 반응조건이 양호하였다. 이와 같이 미숙배의 발육단계별로 성장조절제 처리를 달리하여 배양한 결과 주로 未熟胚의 자엽에서 캘러스 및 胚發生이 이루어졌는데 성장조절제의 종류와 농도에 따라 약간 차이는 있었으나 비교적 양호한 결과였다.

摘 要

고추냉이의 미숙배를 魚雷型 胚(stage I)와 자엽기의 未熟胚(stage II)로 구분하여 캘러스, 胚發生 및 식물체 再分化에 미치는 성장조절제의 효과와 치상적기를 조사하였다. 캘러스 및 배발생은 미숙배의 자엽부분에서 관찰되었는데 캘러스의 양상에 따라 器官分化和 胚發生이 이루어졌다. 캘러스 형성률은 stage I의 경우 1.0 mg/L IAA에서, stage II

의 경우 1.0 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L BA 혼용처리구에서 가장 良好하였다. 체세포배 발생은 stage I의 미숙배는 성장조절제 무처리구에서, stage II의 未熟胚는 1.0 mg/L IAA 처리구에서 가장 높았으며 캘러스를 통하거나 子葉에서 직접 발생되었다. Stage II의 미숙배가 stage I에 비해 캘러스 및 體細胞胚 발생이 왕성하였다. 이들 체세포배는 동일 배지에서 계대배양하여 정상적인 식물체로 再生되었다.

謝 辭 - 본 논문은 교육부에서 지원하는 1994년도 농업과학 학술연구조성비의 지원에 의하여 수행되었으며 연구과제 “고추냉이의 품질 및 생산성 향상에 관한 연구” 결과의 일부임.

引用 文 獻

- 春木和久 (1991) ワサビの不定胚誘導と植物體再生. Bio Horti. 5卷 誠文堂新光社 pp 28-29.
- 細木高志, 白石一剛, 岩井元康, 稻葉久仁雄 (1988) ワサビの組織培養 養苗の増殖 - 増殖能力の維持と耐暑性系統の選抜 -. 農業および園藝 63: 653-654
- 細木高志, 角田和美, 浜田守彦, 瀬尾光廣 (1986) ワサビの組織培養による増殖. 農業 および園藝 61: 995-996
- 松本 理, 山本雄慈 (1986) 日本園藝學會研究發表要旨. 昭62春季 p 332-333.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-479
- Nakamura S, Sathiyamoorthy P (1990) Germination of *Wasabia japonica* Matsum. seeds. *J Japan Soc Hort Sci* 59: 573-577
- Nakamura S, Sathiyamoorthy P (1990) Storage of *Wasabia japonica* Matsum. seeds. *J Japan Soc Hort Sci* 59: 579-587
- 大塚壽夫 (1988) ワサビの増殖法. 農業および園藝 63: 185-189.
- Roy AT, De DN (1990) Tissue culture and plant regeneration from immature embryo explants of *Calotropis gigantea* (Linn.) R. Br. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 20: 229-233
- 鈴木春夫 (1976) ワサビ 主要病害の生態と防除. 植物防疫 30: 374-378
- Vieitez AM, Barciela J (1990) Somatic embryogenesis and plant regeneration from embryonic tissue of *Camellia japonica* L. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 21: 267-274
- Wilcox McCann A, Cooley G, Van Dreser J (1988) A system for routine plantlet regeneration of sunflower (*Helianthus annuus* L.) from immature embryo-derived callus. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 14: 103-110
- 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. 日本園藝學會研究發表要旨. 昭63秋季 p 740

(1995년 7월 23일 접수)