

ヒロシマナの胞子培養による植物体再生

長久 逸・井本 征史

キーワード: ヒロシマナ, 胞子培養, 不定胚, 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る広島県特産のツケナである。草姿は開張性で、葉色は濃緑色を呈し、中肋は幅広く鮮緑色で、類似したツケナ類は見当らない。産地では自家採種による在来系統の栽培が行われており、生育及び品質が均一な F₁ 品種の育成が望まれている。

F₁ 品種を育成するためには、まず形質の固定した有望な交配親を育成しなければならない。交雑育種法では、形質を固定するには 6~7 世代以上の自殖が必要である。薬培養や胞子培養による半数体植物を利用した半数体育種手法は、遺伝的にホモの個体を直接得ることができるため、交配親を育成するために必要な形質の固定の期間を省くことができる。

B. campestris の薬培養による不定胚誘導については、Keller 等⁹⁾、Matsumoto 等¹⁰⁾、Sato 等¹³⁾、鈴木等¹⁹⁾等の報告がある。また、*B. campestris* の胞子培養による不定胚誘導についても、Lichter²⁾、Sato 等¹⁴⁾、Burnett 等²⁾等の報告がある。しかし、ヒロシマナの属する *B. campestris* のツケナ類の胞子培養に関しては報告がない。

薬培養では薬を蕾から取り出して置床する操作が必要であるが、胞子培養は蕾ごと薬をつぶして胞子を遊離させて培養するため、薬培養に比べて一度に多数の薬由来の胞子を培養できる利点がある。

本研究では、ヒロシマナの半数体育種手法の確立を目的に、ヒロシマナの胞子培養法を検討した結果、胞子からの不定胚誘導及び植物体再生に成功したので報告する。

材料及び方法

1. 胞子の単離

材料のヒロシマナとして、井谷種苗の「1号広島菜」、

「広島菜 (川内産)」の 2 品種及び広島県立農業技術センターで保存している木原系、倉本系、田平系の 3 系統を用いた。本葉が 1~2 枚展開した苗を、3.5℃ で 4 週間春化处理を行い、11月上旬に 12cm ポリポットに定植後、無加温のガラス室内で栽培した。抽苔し始めた開花前の株の主茎の蕾を、70% エタノールに数秒間浸漬後、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い、滅菌水で 3 回洗浄した。Gamborg 等の培地⁴⁾ (B5 培地) の CaCl₂·2H₂O を 750mg/ℓ、ショ糖濃度を 13% に修正した植物ホルモン無添加の液体培地 (修正 B5 培地¹⁹⁾) 中で、2.0~2.5mm 長の蕾を乳鉢を用いてつぶし、胞子を培地中に遊離させた。この懸濁液を 50μm のナイロンメッシュでろ過し、残渣を取り除いた。ろ液を 1,000rpm で 3 分間遠心し、沈殿した胞子に修正 B5 培地を加え、1,000rpm で 3 分間遠心する洗浄操作を 3 回繰り返して胞子を精製した。

2. 胞子からの不定胚誘導

単離した胞子は、0.05mg/ℓ 6-benzylaminopurine (BA)、0.5mg/ℓ naphthalene acetic acid (NAA) を添加した修正 NLN 液体培地⁶⁾ (多量要素を 1/2 の濃度にした Nitsch and Nitsch 1967¹¹⁾ の培地に、800mg/ℓ グルタミン、100mg/ℓ セリン、30mg/ℓ グルタチオン、13% ショ糖を添加し、pH を 6.0 に調整後ろ過滅菌したもの) に胞子密度が 1×10⁵個/ℓ 及び 2×10⁵個/ℓ になるように懸濁し、直径 6cm のプラスチックシャーレに 2ml ずつ入れて培養した。培養条件は、33℃ の暗黒下で 1~2 日間培養後、25℃、暗黒下で培養した。1 試験区当り 1~3 個のシャーレを用い、培養 3 週間後に形成された不定胚の数を調査して、シャーレ 1 個当りの平均不定胚数を算出した。

3. 不定胚からの植物体再生

不定胚からの苗木再生は、「広島菜 (川内産)」及び田平系で誘導された子葉形成期の不定胚を、2 種類の再生

培地に移植して検討した。不定胚は、直径6 cmのプラスチックシャーレに分注した B5 寒天培地(植物ホルモン無添加, 寒天0.8%) 及び B5 寒天培地の表面にろ紙を1枚載せた培地に移植し, 25°C, 2,000lux, 10時間照明下で培養した。移植73日, 114日後に不定胚からの苗条再生を調査した。

再生した苗条は, 切り取って B5 寒天培地(植物ホルモン無添加, 寒天0.8%)に移植し, 25°C, 2,000lux, 10時間照明下で培養して発根させた。発根した幼植物体は, バーマキュライトに移植して順化後, 12cmポリポットに鉢上げて栽培した。

実験結果

1. 小孢子からの不定胚誘導

単離した小孢子は, 33°Cで1日間前培養後には肥大し(Fig.1A), 培養開始2日後には, 肥大した小孢子の一部が細胞分裂していた(Fig.1B)。¹ '広島菜(川内産)'の培養密度 2×10^5 個/ml, 前培養33°Cの1日間処理区において, 培養2日後の小孢子的肥大の頻度は13.9%, 培養6日後の細胞分裂率は6.7%であった。

分裂した小孢子は, 培養6~8日後には球状型不定胚に発達したが(Fig.1C), 大部分の分裂した小孢子は1~2回の細胞分裂後に分裂を停止した。数回の細胞分裂

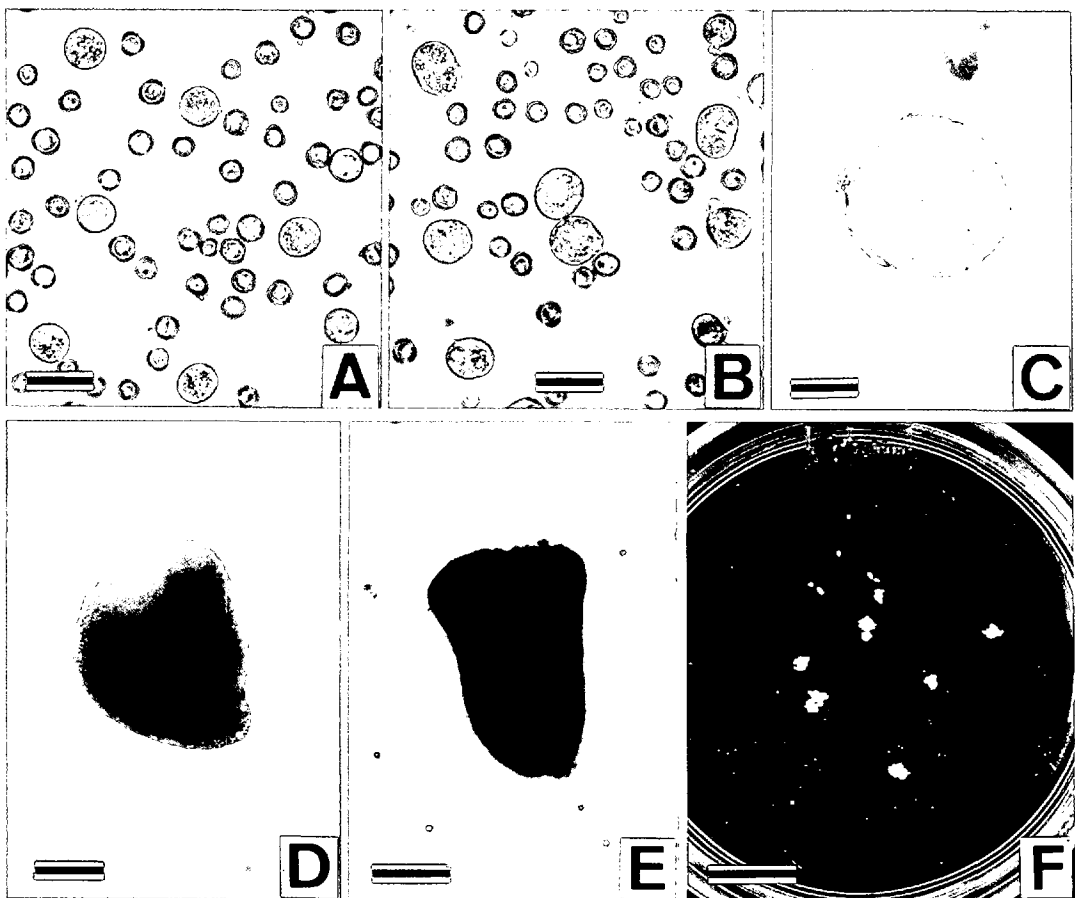


Fig.1 Embryogenesis in microspore culture of *B. campestris* cv. 'Hiroshimana'.

A: Enlargement of microspores after 1 day of culture. B: First cell division after 2 days of culture. C: Globular embryo after 8 days of culture. D: Heart embryo after 12 days of culture. E: Torpedo embryo after 15 days of culture. F: Microspore-derived embryos after 20 days of culture. Bars indicate 50 μ m (A-C), 100 μ m (D), 200 μ m (E), 1cm (F), respectively.

Table 1 Effects of genotypes, preculture treatment and culture density on embryo formation in microspore culture of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* cv. 'Hiroshimana'.

Genotype	Preculture treatment at 33°C (days)	microspore density (/ml)	No. of embryos produced ^a				No. of embryos produced per 10 ⁵ microspores
			Globular	Heart	Torpedo - Cotyledonary	Total	
'Ichigou Hiroshimana'	1	1×10 ⁵	1	0	0	1	0.5
	1	2×10 ⁵	0.5	0.5	0	1	0.3
	2	1×10 ⁵	2.3	0.3	0.7	3.3	1.7
	2	2×10 ⁵	3	0.5	0.5	4	1.0
'Hiroshimana' from Kawauchi	1	1×10 ⁵	0.5	0	2.5	3	1.5
	1	2×10 ⁵	3	1	5	9	2.3
	2	1×10 ⁵	1	0.5	6.5	8	4.0
	2	2×10 ⁵	5	2	9	16	4.0
Kihara	1	1×10 ⁵	0	0	0.3	0.3	0.2
	1	2×10 ⁵	1	0	0	1	0.3
	2	1×10 ⁵	0	0	0	0	0
	2	2×10 ⁵	0	0	0	0	0
Kuramoto	1	1×10 ⁵	0	0	0	0	0
	1	2×10 ⁵	0	0	0	0	0
	2	1×10 ⁵	0	0	0.5	0.5	0.3
	2	2×10 ⁵	0	0	1	1	0.3
Denbira	1	1×10 ⁵	0	0	3	3	1.5
	1	2×10 ⁵	2	0	6	8	2.0
	2	1×10 ⁵	1	0.5	4	5.5	2.8
	2	2×10 ⁵	2	1	7	10	2.5

a Average number of embryos per 60×15 mm petri dish after 3 weeks of culture. 1-3 replications.

で生じた細胞塊から球状型の不定胚に発達する過程は急速で、球状型の不定胚は液体培地の表面に浮いた状態で観察された。球状型の不定胚は、心臓型 (Fig.1D)、魚雷型 (Fig.1E) と発達し、培養3週間後には子葉形成期の不定胚に発達した (Fig.1F)。子葉形成期の不定胚には、奇形化した子葉及び未発達の胚軸等の奇形が多く認められた。

不定胚の発達において、球状型、心臓型の段階で発達を停止する不定胚も認められた。また、小孢子が細胞分裂後、不定胚に発達せずに不定形の細胞塊になるものが認められた。

ヒロシマナの2品種・3系統の小孢子培養を行った結果を Table 1 に示す。いずれの品種・系統においても、不定胚が小孢子から直接的に誘導された。不定胚形成数は、1シャーレ当たり0.3-16個で、不定胚形成率は培養し

た小孢子に対して0.0002-0.004%であった。供試した品種・系統の中で、不定胚形成が良かったのは '広島菜 (川内産)' 及び田平系であった。不定胚形成が最も良かった試験区における不定胚形成効率 (小孢子10⁵個当たりの不定胚形成数) は、'広島菜 (川内産)' では4.0個、田平系では2.8個であった。木原系及び倉本系では不定胚形成が悪く、不定胚形成が最も良かった試験区における不定胚形成効率は、それぞれ0.3個に過ぎなかった。また、'1号広島菜' は、'広島菜 (川内産)' 及び田平系に比較して、球状型で発達を停止する不定胚の割合が高かった。

33°Cの前培養の日数が、不定胚形成に及ぼす影響について検討した結果、木原系を除く2品種・2系統において、2日間処理区が1日間処理区より不定胚形成が良かった。

培養密度が不定胚形成に及ぼす影響について検討した

結果、1シャーレ当りの不定胚形成数は、培養密度 2×10^5 個/ml 区が 1×10^5 個/ml 区よりも良く、'1号広島菜'を除く1品種・3系統では、培養密度 2×10^5 個/ml 区が 1×10^5 個/ml 区と比較して約2倍の不定胚形成数であった。しかし、不定胚形成効率を比較すると、培養密度 1×10^5 個/ml 区と 2×10^5 個/ml 区の不定胚形成効率は、ほぼ同様であった。

2. 植物体再生

子葉形成期の不定胚を再分化培地に移植すると、不定胚は1～2日後には緑色になったが、胚軸や子葉が肥大し、大部分の不定胚は本葉を直接的に分化しなかった。しかし、胚軸や子葉の一部に不定胚と考えられる組織が形成され、再分化培地に移植2～3か月後には苗条が再生した。(Fig.2A)。これらの二次的な不定胚には奇形のものが多く、それらの一部の不定胚から苗条が形成された。

また、球状型、心臓型及び初期魚雷型の不定胚は、再分化培地に移植すると、発根またはカルス化して、苗条を再生しなかった。

B5寒天培地とB5寒天培地の表面にろ紙を1枚載せた培地における、不定胚からの苗条再生の結果をTable 2に示した。B5寒天培地の上のろ紙を載せた培地区の苗条再生率は63.6%、B5寒天培地区の苗条再生率は39.1%であり、ろ紙を載せた培地区が苗条再生率が高かった。ろ紙を載せた培地区では、組織の水浸状化が抑制され、B5寒天培地区に比べて健全な苗条が再生した。また、苗条再生率は、再分化培地移植73日後では17.4～20.5%、114日後では39.1～63.6%であり、不定胚からの苗条再生は長期間を要した。

再生した苗条は、切り取ってB5寒天培地に移植すると、容易に発根して幼植物体となり(Fig.2B)、その後容易に順化、鉢上げして開花させることができた(Fig.2C)。

34個の不定胚由来の植物体を鉢上げして開花させた結果、27個体は正常な花器を有して2倍体、3個体は小型で不稔の花器を有して半数体、残りの4個体は大型で稔性のある花器を有して4倍体とそれぞれ推定された。一部の2倍体については自家受粉により多数の種子が得られた。

考 察

1. 小胞子からの不定胚誘導

ヒロシマナ2品種・3系統の単離した小胞子を33℃で1～2日間前培養後、25℃で培養した結果、小胞子から

の直接的な不定胚形成が認められた。*B. campestris* の小胞子培養による不定胚誘導に関しては、Lichter⁹⁾、ハクサイを用いたSatoら¹⁴⁾¹⁵⁾及び釘貫ら^{7,8)}、和種ナタネを用いたBaillieら¹⁾及びBurnettら²⁾の報告がある。しかし、ヒロシマナの属する*B. campestris* のツケナ類の不定胚誘導は報告されておらず、本報告が最初のものとなる。

小胞子からの不定胚誘導に必要な高温での前培養については、33℃の1日間と2日間を検討した結果、2日間の前培養が不定胚誘導に適していると考えられた。この結果は、和種ナタネにおいてBaillieら¹⁾が報告した33℃、2日間が効果的であるとする結果と一致した。

不定胚形成が最も良好であった'広島菜(川内産)'の不定胚形成率は、培養した小胞子に対して0.004%であった。これは、Satoら¹⁴⁾が報告した南方型のハクサイでの不定胚形成率0.25%よりもかなり低く、Burnettら²⁾が報告した和種ナタネでの不定胚形成率0.003%、及び釘貫ら⁷⁾が報告した山東型のハクサイ'新あずま'での不定胚形成率0.005%に近い値である。

ヒロシマナ2品種・3系統において、不定胚形成に品種・系統間差異が認められ、遺伝子型が不定胚形成に大きく影響していると考えられた。Baillieら¹⁾、Burnettら²⁾及び釘貫ら⁷⁾は、*B. campestris* の小胞子培養において、遺伝子型が不定胚形成能に大きく影響することを報告している。さらに、釘貫ら⁷⁾は、この不定胚形成能は優性に遺伝すると推測される結果を報告している。今後、ヒロシマナにおいても不定胚形成能の遺伝性等について調査していく必要がある。遺伝性が確かめられれば、不定胚形成能の高い系統を探索または育成することにより、小胞子培養の効率化が可能になる。

ヒロシマナの小胞子培養で誘導された大部分の不定胚は、子葉及び胚軸に奇形が認められた。Chuongら³⁾及びSatoら¹⁴⁾は、それぞれ西洋ナタネ(*B. napus*)及びハクサイの小胞子培養において、誘導された不定胚に奇形が生じていることを観察し、これらの奇形の不定胚は、正常に植物体に発達する割合が低いと報告している。不定胚の奇形の要因の一つとして、培地に添加している植物ホルモンの影響が考えられるため、不定胚の奇形に及ぼす植物ホルモンの影響を明らかにする必要がある。

2. 不定胚からの植物体再生

ヒロシマナの小胞子由来の不定胚を再分化培地に移植した結果、大部分の不定胚は本葉を直接的に分化しなかった。大部分の不定胚は、胚軸が肥大した後、胚軸に二次的に不定胚が形成され、2～3か月後に苗条を再生した。これらの苗条は、切り取って発根させることにより、

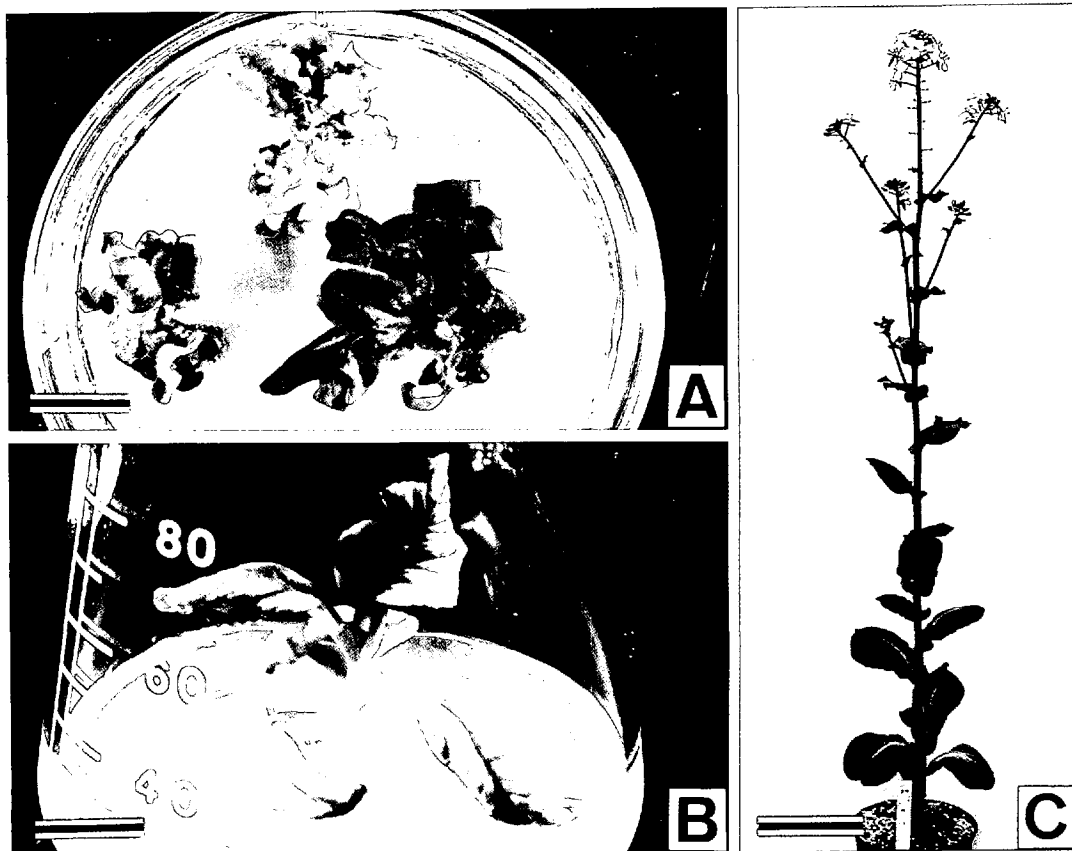
Table 2 Shoot regeneration of microspore-derived embryos under two culture conditions.

Culture condition	Genotype	No. of embryos ^a cultured	Shoot regeneration	
			after 73 days	after 114 days
B5 agar medium	'Hiroshimana' from Kawauchi	16	3(18.8) ^b	4(25.0)
	Denbira	7	1(14.3)	5(71.4)
	Total	23	4(17.4)	9(39.1)
Filter paper ^c	'Hiroshimana' from Kawauchi	29	4(13.8)	19(65.5)
	Denbira	15	5(33.3)	9(60.0)
	Total	44	9(20.5)	28(63.6)

a Cotyledonary embryos.

b Values in parentheses are % of shoot regenerating embryos.

c Filter paper placed on top of B5 agar medium.

Fig.2 Shoot and Plant regeneration from microspores of *B. campestris* cv. 'Hiroshimana'.

A: Shoot development from microspore-derived embryos after subculture onto a filter paper placed on top of B5 agar medium without hormone. B: A regenerated plantlet with roots on B5 agar medium without hormone. C: A regenerated plant with flowering. Bars indicate 1cm (A, B), 10cm (C), respectively.

植物体に再生した。

Chuong ら⁹⁾は、西洋ナタネの小孢子培養において、小孢子由来の不定胚の大部分は、再生培地に移植すると肥大した奇形組織となり、数回の継代培養により苗条を形成したと報告している。また、Baillie ら¹⁾の和種ナタネの小孢子培養の報告でも、小孢子由来の不定胚が本葉を直接的に生じて幼植物体となった頻度は20%以下で、他の不定胚は、胚軸が肥大し、数回継代培養することにより苗条を形成したと報告している。このように Brassica 属の小孢子培養では、誘導された不定胚からの植物体再生の効率が悪く、長期間を要する。

Keller ら⁶⁾は、西洋ナタネの小孢子培養において、植物ホルモン無添加の培地で誘導した不定胚が、正常に発達して植物体になる割合が高いと報告してゐる。釘貫ら⁸⁾は、ハクサイの小孢子培養において、植物ホルモン無添加の培地で誘導した不定胚は、植物体再生率が高かったと報告している。今後、ヒロシマナについても、植物ホルモン無添加の培地での不定胚誘導及び植物ホルモン無添加の培地で誘導した不定胚からの苗条再生について検討する必要がある。

Takahata ら¹⁷⁾は、キャベツ (*B. oleracea*) の小孢子培養において、シャーレ内の寒天培地の表面にろ紙を載せ、その上に不定胚を移植することにより、効率的に不定胚から直接的に植物体を形成させた。今回、ヒロシマナの小孢子培養にこの方法を用いた結果、不定胚からの直接的な植物体形成は観察されなかった。しかし、二次的な不定胚形成等を経由した植物体再生率が、寒天培地に比べて向上した。ろ紙の上に不定胚を移植することにより組織の水浸状化が抑制され、苗条形成が向上したと考えられた。今後、小孢子由来の不定胚から直接的に植物体を形成させるために、不定胚誘導及び植物体再生の培地条件を検討する必要がある。

ヒロシマナの小孢子培養において、小孢子由来の植物体34個体中80%弱は、花器の形態から2倍体と推察されたが、染色体の観察による倍数性の確認を行う必要がある。小孢子培養で再生した植物体中の2倍体の頻度に関して、Baillie ら¹⁾は和種ナタネでは20%、Sato ら¹⁴⁾はハクサイでは87.5%と報告している。ヒロシマナの小孢子培養における2倍体の出現頻度は、ハクサイでの報告と同様に高かった。

小孢子培養では、蕾または葯組織の混入は考えられないため、これらの2倍体植物は、小孢子由来の半数性細胞の染色体が培養過程で倍加したものと考えられる。2倍体植物を半数体育種に利用するためには、2倍体植物が確かにホモ接合体であるかどうかの確認が必要であり、

自殖後代について形質が固定しているかどうかを検討していく必要がある。

本研究において、ヒロシマナの小孢子培養により小孢子からの直接的な不定胚形成を経由した植物体再生が明らかとなった。しかし、不定胚形成の効率が低く、不定胚からの植物体再生に長期間を要した。小孢子培養による半数体育種法を実用化するためには、不定胚形成及び不定胚からの植物体再生の効率を高めることが必要である。小孢子培養の効率的な培養系が確立できれば、純系の育成による育種年限の短縮ばかりでなく、突然変異育種への適用及び遺伝子導入への利用が可能となる。

摘 要

1. ヒロシマナの半数体育種法を確立するために、2品種・3系統を用いて、小孢子培養による小孢子からの不定胚誘導及び不定胚からの植物体再生について検討した。

2. 2.0~2.5mmの蕾から単離した小孢子を、0.05mg/ℓ BA, 0.5mg/ℓ NAA を添加した修正 NLN 培地に調整し、33℃、1~2日間前培養後、25℃、暗黒下で培養した結果、供試した全ての品種・系統において、小孢子から直接的に不定胚が誘導された。

3. 不定胚形成には品種・系統間差が認められ、最も適した培養条件での不定胚形成率は、培養した小孢子に対して0.004%であった。

4. 子葉形成期の不定胚を B5 寒天培地上に載せたろ紙に移植すると、60%以上の不定胚が苗条を分化し、植物体に再生した。

5. 再生植物34個体中27個体は染色体が倍加した2倍体で、一部については自家受粉により種子が得られた。

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から有益な指導と助言をいただいた。ここに感謝の意を表する。

引 用 文 献

- 1) BAILLIE, A. M. R., D. J. EPP, D. HUTCHENSON and W. A. KELLER : 1992. In vitro culture of isolated microspores and regeneration of plants in *Brassica campestris*. Plant Cell Reports 11 : 234-237.
- 2) BURNETT, I., S. YARROW and B. HUANG : 1992.

Embryogenesis and plant regeneration from isolated microspores of *Brassica rapa* L. ssp. *oleifera*. Plant Cell Reports. 11 : 215-218.

3) CHUONG, P. V. and W. D. BEVERSDORF : 1985. High frequency embryogenesis through isolated microspore culture in *Brassica napus* L. and *B. carinata* Braun. Plant Sci. 39 : 219-226.

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) KELLER, W. A., T. RAJHATHY and J. LACAPRA : 1975. In vitro production of plants from pollen in *Brassica campestris*. Can. J. Genet. Cytol. 17 : 655-666.

6) KELLER, W. A., Z. FAN, P. PECHAN, N. LONG and J. GRAINGER : 1987. An efficient method for culture of isolated microspores of *Brassica napus*. The 7th international rapeseed conference, Poland 11-14 May. pp. 152-157.

7) 釘貫靖久, 中村幸司, 吉川宏昭 : 1990. ハクサイの小孢子培養 (第1報) 胚様体形成能の品種間差異. 園学雑. 59 (別2) : 268-269.

8) 釘貫靖久, 中村幸司, 吉川宏昭 : 1991. ハクサイの小孢子培養 (第2報) 胚様体形成能の遺伝および植物体再生能の品種間差異. 園学雑. 60 (別2) : 212-213.

9) LICHTER, R. : 1989. Efficient yield of embryoids by culture of isolated microspores of different Brassicaceae species. Plant Breeding 103 : 119-123.

10) MATSUMOTO, E., M. FUJIMORI and F. OTANI :

1989. Production of haploid plants via microspore embryogenesis in chinese cabbage anther culture. Bull. Nagano Veg. and Orn. Crops Exp. Sta. 5 : 9-14.

11) 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.

12) 大川安信 : 1988. ナタネの花粉培養による育種技術. 農業および園芸 63 : 141-145.

13) SATO, T., T. NISHIO and M. HIRAI : 1989. Varietal differences in embryogenic ability in anther culture of Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*). Japan. J. Breed. 39 : 149-157.

14) SATO, T., T. NISHIO and M. HIRAI : 1989. Plant regeneration from isolated microspore cultures of Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*). Plant Cell Reports 8 : 486-488.

15) 佐藤隆徳・西尾 剛・平井正志 : 1989. ハクサイ (*Brassica campestris* L.) の小孢子培養における初期培養条件. 野菜・茶業試験場研究報告 A 3 : 55-65.

16) 鈴木誠一・庄子孝一 : 1993. 薬培養によるオニコウベナ (*Brassica campestris* cv. Onikoubena), カラシナ (*B. juncea*) の半数体作出. 宮城農セ報. 59 : 6-12.

17) TAKAHATA, Y. and W. A. KELLER : 1991. High frequency embryogenesis and plant regeneration in isolated microspore culture of *Brassica oleracea* L. Plant Sci. 74 : 235-242.

Plant Regeneration in Microspore Culture of
Brassica campestris ssp. *pekinensis* cv. 'Hiroshimana'

Suguru CHOKYU and Masashi IMOTO

Summary

Embryogenesis and plant regeneration in microspore culture of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* cv. 'Hiroshimana' were investigated. Microspores were isolated from buds 2.0-2.5mm in length and cultured in modified NLN medium supplemented with 0.05 mg/ℓ BA and 0.5 mg/ℓ NAA. After 1-2days preculture treatment at 33°C, microspores were cultured at 25°C in the dark. Although embryogenesis was observed in all 5 genotypes tested, yield of embryos was influenced by genotype. Efficiency of embryogenesis was estimated to be 0.004% with optimal conditions.

More than 60% of microspore-derived cotyledonary embryos regenerated shoots when they were transferred into a filter paper placed on top of B5 agar medium without hormone. Shoots produced roots on B5 agar medium without hormone and grew into plantlets.

27 plants out of 34 regenerated plants were diploid and some of them set seed after selfing.

Key words : *Brassica campestris*, microspore culture, embryo, plant regeneration, Hiroshimana