

フキ無菌植物の葉柄切片からの不定芽誘導

誌名	愛知県農業総合試験場研究報告 = Research bulletin of the Aichi-ken Agricultural Research Center
ISSN	03887995
著者	浅見, 逸夫 伊藤, 理恵 犬塚, 満 朱宮, 昭男
巻/号	31号
掲載ページ	p. 65-70
発行年月	1999年12月

フキ無菌植物の葉柄切片からの不定芽誘導

浅見逸夫*・伊藤(小川)理恵**・犬塚満**・朱宮昭男***

摘要: 組織培養によるフキの簡易な増殖法を開発するために、1mmの厚さに切断した無菌植物の葉柄切片を寒天培地上に置床し、不定芽を誘導する方法を検討した。

葉柄切片から効率的に不定芽を誘導する好適な培地・培養条件は以下のとおりであった。葉柄切片を採取する葉は、葉齢の若い葉を用いる方が老化した葉を用いるよりも切片からの不定芽分化率が高かった。寒天培地への切片の置床方法は、葉身方向の切断面を寒天上に置床する(反転置床)方が、その反対の葉柄基部方向の置床に比べ不定芽分化率が高かった。培地の種類は二分の一濃度のMS培地あるいはアンモニア態窒素を除いたMS培地よりもMS基本培地の方が、また、培地に添加するショ糖の濃度は $30\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ 以下よりも $40\sim 50\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ と高い方が、それぞれ不定芽分化率が高かった。したがって、ショ糖 $40\sim 50\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ 、NAA $0.1\sim 0.2\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ +BA $0.2\sim 0.5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ を添加したMS寒天培地に葉柄切片を反転置床することによって、切片から不定芽を90%以上の率で誘導することができた。

キーワード: フキ、愛知早生、組織培養、大量増殖、葉柄、切片、不定芽、分化、反転置床

Adventitious Shoot Induction from Petiole Segments of the Sterile Plants in Japanese Butterbur(*Petasites japonicus* Fr.Schmidt)

Itsuo ASAMI, Rie ITO-OGAWA, Mitsuru INUZUKA and Akio SYUMIYA

Abstract: To develop a simple clonal mass-propagation method of Japanese butterbur (cv.Aichi-wase), we investigated an induction method of adventitious shoots from petiole segments, which were cut from the sterile plants with 1mm thick, by inoculating on agar culture medium.

The favorable culture mediums and conditions for efficient adventitious shoot induction were as follows: adventitious shoot regeneration rate in the petiole segments of young foliage leaf was higher than those of old foliage leaf. When the petiole segments were inoculated its side of acropetal direction on the agar medium (upside-down inoculation), the regeneration rate was higher than basipetal direction. And also, the adventitious shoot regeneration rate cultured on Murashige and Skoog's(MS) medium was higher than the MS medium with a half strength of minerals and MS medium without NH_4NO_3 , and the regeneration rate cultured on the MS medium containing $40\sim 50\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ sucrose was higher than $30\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ or less sucrose, respectively. Thus, the adventitious shoots were able to regenerate with 90% or more, when petiole segments turned upside-down were inoculated on MS agar medium containing $40\sim 50\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ sucrose, $0.1\sim 0.2\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ NAA and $0.2\sim 0.5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BA.

Key Words: Japanese butterbur, Aichi-wase, Tissue culture, Clonal mass-propagation, Petiole segment, Adventitious shoot, Regeneration, Upside-down inoculation

緒 言

フキの組織培養による増殖の研究は数多く行われており、松原⁴⁾、森下⁵⁾の総説にも紹介されているが、ウィルスフリー化や増殖に関して茎頂培養^{3,15)}カルス培養^{6,8,14)}、苗条原基^{8,17)}、体細胞不定胚¹⁸⁾等の報告がある。その内、茎頂^{3,9)}以外の外植片としては、雌小花⁵⁾、葉柄^{3,14)}、葉身^{3,14)}が用いられている。多くの報告はそれら外植片からカルスを誘導し、増殖したカルスを分割して数を増やし、その後不定芽を分化させる、いわゆる「カルス・不定芽誘導法」である。この方法では、①カルスの増殖、②不定芽の分化、③発根、の3段階の培養操作が必要である。

一方、外植片からの「不定芽直接誘導法」はカルス増殖をしないので、増殖の操作は1回少なくなる。松原³⁾はフキの茎頂培養に関する報告の中で、種々の外植片からの不定芽の直接誘導を試みた結果、葉柄からの不定芽の分化率は非常に低かったが、植物体全部から取れる外植片の数を考慮すれば、結果的には効率的な増殖ができると述べている。筆者らは、組織培養によるフキの簡易な増殖法を開発するため、葉柄を薄く切断して多数の切片を得て、不定芽を直接誘導する方法を検討した。その結果、無菌植物の葉柄切片から、高い率で不定芽を誘導することができたので報告する。

材料及び方法

供試材料として、ホルモンを含まないMurashige and Skoog 培地¹⁰⁾ (以下MS培地) で継代培養したフキ品種「愛知早生」の茎頂由来無菌植物を用いた。不定芽を誘導する外植片は、15mm以上の長さ伸長した葉を葉柄基部で切り取り、約1mmの厚さに切断し葉柄切片とした。不定芽誘導用の培地はMS基本培地 (pH5.7) を用い、糖質としてシヨ糖を添加した。培地に添加するホルモンは、オーキシシンとしてナフタレン酢酸 (以下NAA)、サイトカイニンとして6-ベンジルアミノプリン (以下BA) を用いた。固体培地のゲル化剤は寒天 ($9\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) を用い、深さ1.5cm直径9cmのプラスチック製ペトリ皿に培地を20ml分注して用いた。培養温度は25℃一定とし、照度約200lx、明期16時間、暗期8時間で行なった。切片の置床後30日から60日までの間に、不定芽が分化した切片数を調査し、置床切片数に対する不定芽分化率 (%) を示した。なお、供試個体数と切片数及び培養期間はそれぞれの結果の表に記した。

試験1 培地のホルモン組成と葉柄切片の置床方法及び切片を採取した葉位 (葉齢) の影響

ホルモンの濃度が不定芽の分化率に及ぼす影響を調べるため、シヨ糖を $30\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ 又は $40\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ 添加したMS基本培地に、NAAを $0\sim 0.5\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 、BAを $0\sim 5.0\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ の範囲で組み合わせ添加した。切片を採取する葉は、展開後間もない葉齢の若い方の葉から順番に第1葉から第4葉までを用い、葉位として示した。切断した厚さ1mm

の葉柄切片は向きを決めて寒天培地上に置床することとし、葉柄基部方向であった切断面を寒天上に置床する場合を普通置床、逆に葉身方向の切断面を置床する場合を反転置床とした。

試験2 培地のシヨ糖濃度の影響

培地に添加するシヨ糖の濃度が不定芽の分化率に及ぼす影響を調査するため、シヨ糖を $0\sim 60\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ の範囲でMS基本培地に添加した。また、シヨ糖 $30\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ に加えて浸透圧調整用にマンニトールを $15\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ 添加する区も設けた。培地にはNAAを $0.2\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 、BAを $1.0\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 添加した。

試験3 培地の無機塩濃度及びホルモン組成の影響

培地の無機塩濃度が不定芽分化率に及ぼす影響を調べるため、培地はMS基本培地、二分の一濃度のMS培地 (MS 1/2)、 NH_4NO_3 を添加せずアンモニア態窒素を除いたMS培地 (MS-NH₄: 窒素濃度が基本培地の約60%) の計3種類を用いた。また、試験1及び2において、葉柄切片の反転置床と培地に添加するシヨ糖濃度を高めることによって不定芽分化率が向上したため、試験1で検討したホルモン条件を再検討した。培地に添加するホルモン条件を再検討するため、NAA $0.1\sim 0.4\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ とBA $0.1\sim 1.0\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ を組み合わせ、計10種類の培地を用いて不定芽分化率を調査した。

結 果

試験1 培地のホルモン組成と葉柄切片の置床方法及び切片を採取する葉位 (葉齢) の影響

シヨ糖 $30\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ を含むMS培地に添加するホルモンについて、NAAを $0\sim 0.5\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ の5水準、BAを $0\sim 0.5\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ の4水準、計20種類の培地に葉柄切片を普通置床したところ、NAA単独あるいはBA単独添加区ではほとんど不定芽が分化しなかった。NAAとBAの両方を添加した区の中では、NAAは $0.1\sim 0.2\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ の範囲が、BAは $0.5\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ が、不定芽分化率が高く、NAA $0.1\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ +BA $0.5\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 区が18%と最も高い分化率であった (第1表)。

第1表 培地のホルモン組成が葉柄切片普通置床2か月後の不定芽分化率に及ぼす影響

BA濃度	NAA濃度 ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)				
	0	0.05	0.1	0.2	0.5
$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$					
	%	%	%	%	%
0	0	0	0	0	2
0.1	0	0	2	10	2
0.2	0	8	2	16	12
0.5	0	8	18	16	12

注: 切片を置床する向きは葉柄基部方向の切断面を寒天上に置床する普通置床とした。寒天培地はMS基本培地、シヨ糖濃度は $30\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ 、供試切片数: 約50個/区。

第2表 培地のホルモン組成と葉柄切片の置床方法が置床2か月後の不定芽分化率に及ぼす影響

BA濃度	NAA濃度(mg・ℓ ⁻¹)			
	0.1		0.2	
	普通置床	反転置床	普通置床	反転置床
mg・ℓ ⁻¹	%	%	%	%
2	0	6	95	88
3	50	15	100	100
4	22	14	86	100
5	55	0	94	93
平均	26	7	94	95

注：葉柄基部方向の切断面を寒天上に置床する場合は普通置床、葉身方向の切断面を置床する場合は反転置床とした。
寒天培地はMS基本培地、シヨ糖濃度は30g・ℓ⁻¹、供試切片数：12~32個/区。

第3表 切片の置床方向が置床50日後の不定芽分化率に及ぼす影響

個体 記号	置床 方向	葉位			
		1枚目	2枚目	3枚目	4枚目
A	反転	100	100	93	
	普通	80	87	73	
B	反転	80	30	50	10
	普通	40	10	10	0

注：寒天培地はMS培地、シヨ糖濃度40g・ℓ⁻¹。ホルモン組成は、NAA0.2mg・ℓ⁻¹+BA1.0mg・ℓ⁻¹。葉位は展開後間もない葉齢の若い方の葉からの位置、供試切片数：30~50個/区。

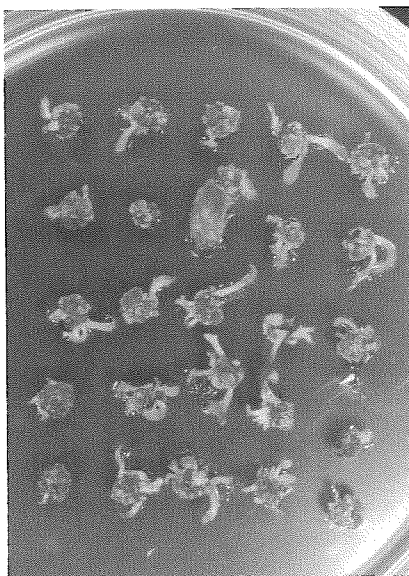
NAA0.1及び0.2mg・ℓ⁻¹の2水準、BA2.0~5.0mg・ℓ⁻¹の4水準、計8種類の培地において、葉柄切片を普通置床したところ、不定芽分化率は7~26%、平均15.6%であった。それに対し、反転置床した場合の分化率は平均94.8%と非常に高かった(第2表)。

葉柄切片を反転置床してから30日後の不定芽分化状況を第1図に示した。切片の切断面がカルス化して盛り上がっているが、不定芽は切片の横あるいは裏側から発生していた。分化した不定芽を寒天培地の裏側から見たところ、カルスからではなく、切片のまわりの葉柄表皮付近から発生していた(第2図)。中には、葉柄を切断した際に表皮が剥がれ、表皮組織が寒天に広がった部分から発生しているものもあった(第3図)。

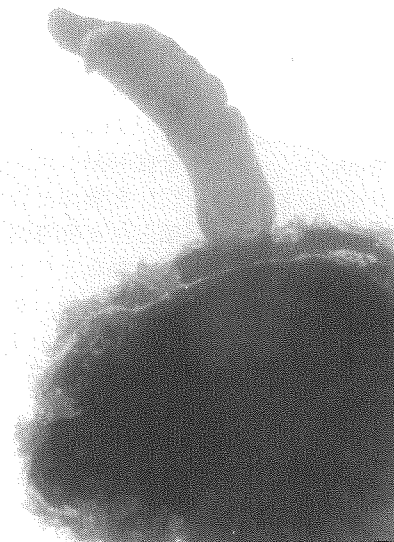
2個体の無菌植物から採取した切片を、シヨ糖30g・ℓ⁻¹とNAA0.2mg・ℓ⁻¹+BA1.0mg・ℓ⁻¹を含むMS寒天培地に、普通置床と反転置床を行なったところ、2個体とも反転置床の方が不定芽分化率が高かった。また、不定芽分化率に個体差があったが、いずれも葉位1枚目の方が3枚目あるいは4枚目よりも分化率が高く、展開後間もない葉齢の若い組織の方が分化しやすい傾向が認められた(第3表)。

試験2 培地のシヨ糖濃度の影響

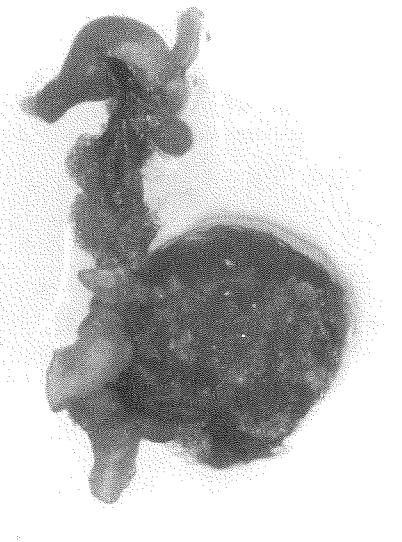
NAA0.2mg・ℓ⁻¹+BA1.0mg・ℓ⁻¹を含むMS寒天培地のシヨ糖濃度を30g・ℓ⁻¹、45g・ℓ⁻¹及び60g・ℓ⁻¹の3段階に設定し、無菌植物6個体を用いて葉位1枚目から3枚目までの葉柄切片を培地に反転置床した。6個体の不定芽分化率の平均値を第4図に示したが、置床30日後においてはシヨ糖濃度が高いほど不定芽分化率も高くなった。しかし、培養45日後に5mm以上に生長した不定芽は、シヨ糖45g・ℓ⁻¹に比べ60g・ℓ⁻¹区の方が明らかに少なかった。



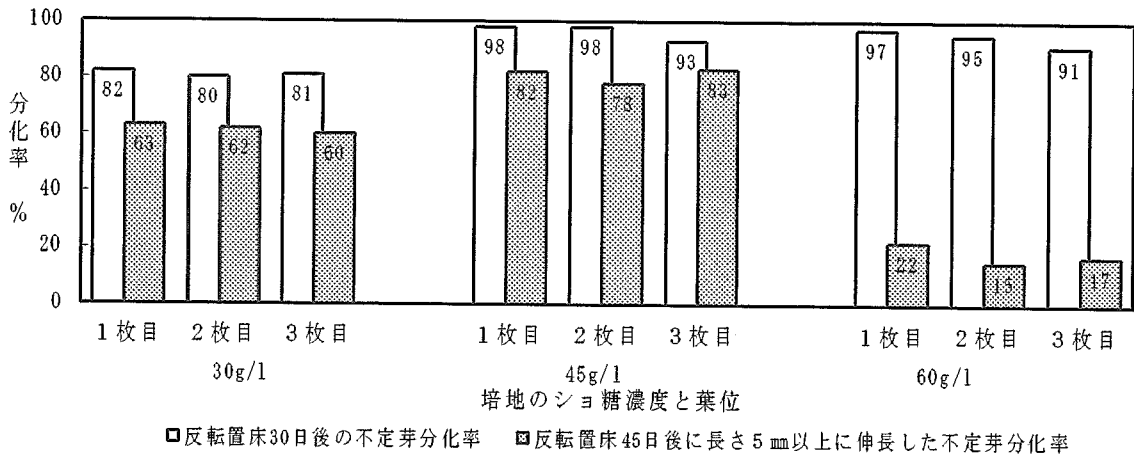
第1図 反転置床1か月後の不定芽の分化状況



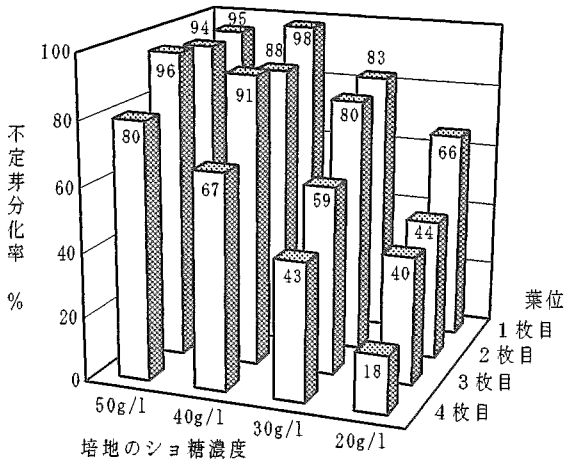
第2図 裏側から見た不定芽の分化状況



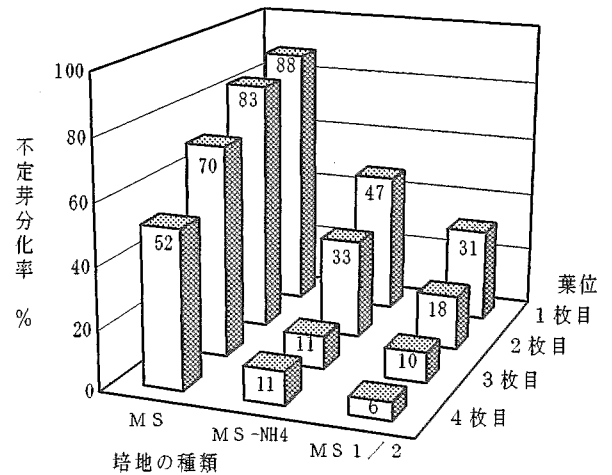
第3図 切片から剥がれた表皮から分化した不定芽



第4図 培地のシヨ糖濃度が反転置床30日後及び45日後の不定芽分化率に及ぼす影響
注：寒天培地はMS培地、ホルモン組成は、 $NAA0.2mg \cdot l^{-1} + BA1.0mg \cdot l^{-1}$ 。



第5図 培地のシヨ糖濃度が反転置床60日後の不定芽分化率に及ぼす影響
注：寒天培地はMS培地、ホルモン組成は $NAA0.2mg \cdot l^{-1} + BA1.0mg \cdot l^{-1}$ 。



第6図 培地の種類が反転置床60日後の不定芽分化率に及ぼす影響
注：培地の種類：MSはMS基本培地、MS-NH4は7%の形態窒素を添加しないMS培地、MS 1/2は基本培地の二分之一濃度、寒天培地はシヨ糖40g・ l^{-1} と $NAA0.2mg \cdot l^{-1} + BA1.0mg \cdot l^{-1}$ を含む。

第4表 培地へのマンニトールの添加が反転置床45日後の葉柄切片の不定芽分化率に及ぼす影響

糖の種類 個体 記号	シヨ糖30g・ l^{-1}			シヨ糖30g・ l^{-1} +マンニトール15g・ l^{-1}		
	葉位 1枚	2枚	3枚目	1枚	2枚	3枚目
	%	%	%	%	%	%
C	100	100	82	100	100	100
D	100	100	100	100	100	100
E	26	30	7	93	87	42
F	100	100	85	100	100	100
平均	82	83	72	98	97	86

注：寒天培地はMS培地、ホルモン組成は、 $NAA0.2mg \cdot l^{-1} + BA1.0mg \cdot l^{-1}$ 、供試切片数：10~20個/区
葉位は展開後間もない葉齢の若い方の葉からの位置。

シヨ糖濃度を20g・ l^{-1} 、30g・ l^{-1} 、40g・ l^{-1} 及び50g・ l^{-1} の4段階に設定し、 $NAA0.2mg \cdot l^{-1} + BA1.0mg \cdot l^{-1}$ を含むMS寒天培地に葉位1枚目から4枚目までの葉柄切片を置床した。その結果、50g・ l^{-1} までの範囲であるならシヨ糖濃度が高いほど不定芽分化率が高く、葉位1枚目から3枚目までの葉柄切片の不定芽分化率は90%以上になった(第5図)。

シヨ糖30g・ l^{-1} と $NAA0.2mg \cdot l^{-1} + BA1.0mg \cdot l^{-1}$ を含むMS培地に、植物に利用されにくい糖アルコールであるマンニトール15g・ l^{-1} を添加すると、マンニトール無添加培地に比べ、不定芽分化率が高くなった(第4表)。

試験3 培地の無機塩濃度及びホルモン組成の影響

MS培地の無機塩の濃度と種類を変えて、 $NAA0.2mg \cdot l^{-1} + BA1.0mg \cdot l^{-1}$ をシヨ糖40g・ l^{-1} の条件で切片を培養したところ、不定芽分化率はMS培地が最も高く、次いでMS-NH₄NO₃培地で、MS 1/2培地区は最も低く、

第5表 培地のホルモン組成が反転置床50日後の葉柄切片の不定芽分化率に及ぼす影響

BA 濃度	NAA濃度	0.1mg・ℓ ⁻¹			0.2mg・ℓ ⁻¹			0.4mg・ℓ ⁻¹		
		葉位	1枚目	2枚目	3枚目	1枚目	2枚目	3枚目	1枚目	2枚目
		%	%	%	%	%	%	%	%	%
0.1mg・ℓ ⁻¹		86	66	60	98	100	93	90	98	86
0.2mg・ℓ ⁻¹		95	88	73	100	100	87	98	98	75
0.5mg・ℓ ⁻¹		88	85	53	97	100	57	98	100	63
1.0mg・ℓ ⁻¹					98	98	84			

注：寒天培地はMS基本培地、シヨ糖濃度は40g・ℓ⁻¹、供試切片数：30～50個/区。
葉位は展開後間もない葉齢の若い方の葉からの位置。

MS培地の半分以下であった（第6図）。

シヨ糖40g・ℓ⁻¹を添加したMS基本培地について、NAA0.1、0.2及び0.4mg・ℓ⁻¹とBA0.1、0.2、0.5及び1.0mg・ℓ⁻¹を組み合わせ、計10種類の培地を比較したところ、NAA0.1mg・ℓ⁻¹+BA0.1mg・ℓ⁻¹の区を除き、いずれの組み合わせにおいても、葉位1枚目と2枚目の不定芽分化率は85%以上で、反転置床と高シヨ糖濃度の影響によりかなり高くなった（第5表）。

考 察

葉柄切片から不定芽を効率的に分化させるための条件として、試験1では、①ホルモンはNAAとBAの両方を添加すること、②切片の置床方向を反転置床とすること、③展開後の日数がたっていない葉齢の若い葉を用いること、が挙げられた。また、不定芽は葉柄の表皮組織付近から分化することもわかった。一般的にホルモン条件としては、茎葉分化にはBA単独が、カルス形成にはNAAとBAの共存が、発根にはホルモン無添加か所定の濃度範囲のNAA添加が有効とされている⁹⁾が、本試験では単独添加では全く不定芽が分化しなかった。また、不定芽が直接誘導される場合、組織片の表皮付近（表皮細胞の第1～2層の細胞）から茎頂組織が誘導されること¹¹⁾、不定芽形成能力の高い部位は植物によって異なるが、何れの組織でも老化組織より若い分裂が盛んな時期の組織の再分化能が高いことが認められており¹²⁾、本試験の結果はそれらと一致していた。

切片の反転置床が不定芽分化率を高めたが、この理由の一つとして、オーキシンが植物体内を極性移動することにも関係していると思われる。胚軸や茎、葉柄でのオーキシンの移動は求頂的（すなわち、形態学的にみて基部から先端部へ）よりも、求基的（先端部から基部へ）の方が速いことが認められている¹⁵⁾ことから、葉では葉身から葉柄基部方向への移動が速い。したがって、反転置床によって切片の葉身方向の切断面が培地に接すると、反対方向（普通置床）に比べて、培地中のオーキシンが切片に吸収されやすく、表皮直下の組織の分裂と不定芽分化が促されるものと推察した。

試験2と3では、培地に添加するシヨ糖濃度は40～50

g・ℓ⁻¹と高い方が、また、培地はMS基本培地が不定芽分化率を高める効果があった。添加するシヨ糖濃度については、マンニトールを添加した第4表の結果のように、浸透圧が不定芽分化率に密接に関係することが示された。しかし、シヨ糖濃度が高すぎても悪影響があり、第4図のようにシヨ糖60g・ℓ⁻¹の添加では、不定芽の分化率は高いが、分化後の不定芽の生長が悪いことから、シヨ糖の適正な添加濃度は40g～50g・ℓ⁻¹と判断している。

これらの結果から、切片の反転置床とシヨ糖濃度を高めた培地を利用することにより、葉位が3枚目あるいは4枚目のやや古い葉の切片からも不定芽を誘導することができたので、利用できる葉数が増えて、結果として1本の培養苗からの増殖率を向上させることができた。この方法によれば、無菌植物の葉柄を1mmの厚さで切断するので、採取する1枚目と2枚目（あるいは3枚目まで）の葉の長さの合計が例えば10cmであるなら、100切片が採取できる。本試験の結果から、不定芽の分化率はおよそ90%であるため、増殖操作の前に継代培養中の無菌植物から得られる最大の切片数と不定芽数が予測できることから、その後の増殖計画が立てやすい。また、茎頂そのものは採取しないため、葉柄を切り取った残りの植物から、1か月後には再び葉柄を採取することができる（データ未掲載）ことも、本方法の特徴である。

また、不定芽直接誘導法はカルス経由の方法に比べて培養変異が発生する可能性が低いと予測されている¹²⁾が、さらに第5表の結果のように、添加するホルモンの濃度を低くしても不定芽分化率が下がらなかったことから、培養変異⁷⁾への影響もできるだけ避けることができると思われる。本試験の結果から、不定芽誘導時のホルモン組成はNAA0.1～0.2mg・ℓ⁻¹+BA0.2～0.5mg・ℓ⁻¹の組み合わせが良いと判断している。なお、葉柄切片を採取する個体によって不定芽分化率が低い例があったが、その原因は不明であり、今後、検討する必要がある。

愛知早生フキの培養に関する主要な研究は森下⁹⁾の総説に紹介されているが、大きな成果としては森下ら⁵⁾の雌小花、矢部ら¹⁴⁾の葉柄、葉身を外植片とした「カルス・不定芽誘導法」が多く、不定芽直接誘導法の成果はわずかである。松原ら³⁾長さ5mmの葉柄をNAAとBAを各0.1mg・ℓ⁻¹又は1.0mg・ℓ⁻¹とシヨ糖30g・ℓ⁻¹を添加した修正MS培地に植え付けたところ、不定芽分化率は15%で

あったことを報告している。

岩本ら²⁾は、花芽分化初期の頭花を用いたウィルスフリー株の増殖方法を検討し、頭花からの茎葉の再生にはNAA0.1mg・ℓ⁻¹+BA1.0mg・ℓ⁻¹を添加したMS培地が最適と報告しており、本試験の培地・ホルモン条件とほぼ同じであった。また、同報告では培養12週後の茎葉再生率は80%で、1頭花当たり5.2本の茎葉が得られている。本試験では、1切片当たりの不定芽数は測定していないが、添加するホルモンがNAA0.2mg・ℓ⁻¹+BA1.0mg・ℓ⁻¹区の場合、その濃度より低い区に比べ、小さい不定芽が数多く分化しているように観察された(データ未掲載)。従来の大量増殖に関する研究では、増殖効率という点から1切片から何本の不定芽が得られたかを問題にしているが、本試験ではそのような考え方を採っていない。なぜなら、1切片から不定芽が数多く発生しても、小さい不定芽を1本ずつ分離して培養する作業は非常に労力がかかること、小さい不定芽の生育と発根までかなり長い培養期間を必要とするからである。本試験では増殖操作をより簡易にするため、不定芽1本ずつを分離することなく、切片を付けたまま発根培養を行い、1切片をそのまま1株の培養苗に仕立てることを想定している。現在、変異への影響を少なくするために不定芽分化率が下がらない範囲で添加するホルモン濃度を低く抑え、1切片から分化する不定芽数の少ない培養方法、ならびにそれらの効率的な発根方法に関して検討中である。

材料として無菌植物を用いる利点は、培養直前に殺菌処理を行なう必要がないことから傷みのない組織を培養できること、制御された同一の環境下で材料を育成するため均一な植物が得られ、培養結果の再現性が高いことが挙げられる。このため、本方法は培養苗の増殖を1年中、安定的に行うことができる。また、今後、本方法は放射線照射等による積極的な変異個体・系統の作出や、遺伝子導入等にも応用できるものと考えられる。

引用文献

1. 岩本嗣・嘉儀隆. フキの発根と培養根からの植物体再生. 育種雑誌38(別1), 24-25 (1988)
2. 岩本嗣・嘉儀隆. 組織培養によるフキ(*Petasites japonicus* Fr.Schmidt) ウィルスフリー株の大量増殖. 大阪農技セ研報. 30, 28-33 (1994)
3. 松原幸子・益田忠雄. フキのウィルスフリー株育成のための茎頂培養. 岡山大農学報. 56, 21-28 (1980)
4. 松原幸子. 植物組織培養の世界, 樋口春三編. 柴田ハリオ硝子(株). 118-123 (1988)
5. 森下正博・山田貴義. フキの茎頂及びカルスからの器官分化について. 近畿作育談話会報. 24, 25-30 (1979)
6. 森下正博・嘉儀隆・山田貴義. フキの花茎および葉柄組織からのウィルスフリー株大量育成. 大阪農技セ研報. 17, 1-6 (1980)
7. 森下正博・山田貴義. フキの組織培養株の形質変異について. 大阪農技セ研報. 18, 9-18 (1981)
8. 森下正博. 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. 174-180 (1990)
9. 村上章・田中隆荘・谷口研司. フキ(*Petasites japonicus*)の苗条原基法による大量クローン増殖. 育種学雑誌. 38(別2), 86-87 (1988)
10. Murashige, T., Skoog, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 173-497 (1962)
11. 大澤勝次. 組織培養による種苗の増殖〔2〕. 農業及び園芸. 63, 274-278 (1988)
12. 田部井豊. 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. 55-60 (1990)
13. Wareing, P.F., Phillips, i.d. 植物の成長と分化, 上. 古谷雅樹訳. 東京, 学会出版センター, 1988, 150-158
14. 矢部和則・桜井雍三・飯田孝則・鷺田純彦. 葉身及び葉柄培養によるフキ(*Petasites japonicus* Fr. Schmidt)無病苗の作出. 愛知農総試研報. 18, 102-109 (1986)
15. 矢部和則・景山幸二・宮島成寿・飯田孝則・桜井雍三・鷺田純彦. フキの茎頂培養による優良株の作出. 園学雑別2, 238-239 (1989)
16. 矢部和則・景山幸二・宮島成寿. フキの葉身組織からの体細胞不定胚形成と植物体再分化. 園学雑59別1, 270-271 (1990)
17. 矢部和則・景山幸二・宮島成寿. フキの茎頂組織からの苗条原基作出と植物体再分化. 園学雑59別2, 316-317 (1990)