

イチゴ品種「とちおとめ」のカルス誘導および再分化条件

高野純一・生井 潔

摘要：とちおとめ無菌培養植物の葉片を外植体として、カルス誘導および再分化条件を検討した。1/3MS を基本にシヨ糖 30g/l, TDZ 1.0mg/l および 2,4-D 0.1mg/l を添加した培地でカルス誘導を行い、MS を基本にシヨ糖 30g/l および TDZ 1.0mg/l を添加した培地での再分化誘導がそれぞれ最適条件であった。供試組織は、多芽体由来培養植物を植物生長調節物質の含まない MS 培地で 1 ヶ月程度培養した個体の最上位葉および次葉の葉身が適していた。この葉片培養法により、年間を通して再分化個体を得ることが可能となった。薬培養法では、LS を基本にシヨ糖 3 g/l, BA 2.0mg/l および NAA 0.02mg/l を添加した培地で薬を培養することにより再分化個体が得られた。

キーワード：イチゴ, カルス誘導, 再分化, 葉片培養, 薬培養

Callus Induction and Shoot Regeneration of Strawberry 'Tochiotome'

Junichi TAKANO, Kiyoshi NAMAI

Summary : Optimal conditions for callus induction and shoot regeneration in the strawberry cultivar 'Tochiotome' were studied using *in vitro* culture of plant leaves. Callus induction on a 1/3-strength MS medium supplemented with sucrose (30g/L), TDZ (1.0mg/L), and 2, 4- D (0.1mg/L) was found to be the most optimal condition, whereas a full-strength MS medium supplemented with sucrose (30g/L) and TDZ (1.0mg/L) was found to be the most optimal condition for shoot regeneration. The youngest two leaves of plants transplanted from *in vitro* cultures for ~1 month to hormone-free MS medium were suitable for use as explants. This leaf culture method can supply-regenerated plants throughout the year.

As for the anther culture method, regenerated plants were obtained by culturing anthers from flower buds containing unicellular pollen on LS medium supplemented with sucrose (3g/L), BA (2.0mg/L), and NAA (0.02mg/L).

Key words : strawberry, callus induction, shoot regeneration, leaf culture, anther culture

緒 言

現在、イチゴの現地栽培ほ場では、萎黄病⁷⁾が多発しており、安定生産の大きな阻害要因となっている。そのため、生産者からは、果実品質の優れた本病耐病性品種が強く望まれている。一般に、イチゴ育種は交配により行われているが、とちおとめ¹⁰⁾と同等の果実品質を有する本病耐病性品種の育成には至っていない。一方、培養変異を利用した育種は、原系統の特徴を残し一部形質のみに変異を生じた個体の作出が期待でき、これまでにアスパラガス⁸⁾、アマ¹⁸⁾、セロリ⁹⁾およびイチゴ²²⁾等いくつかの植物において、フザリウム病耐病性個体選抜の報告がある。

そこで、とちおとめの優良形質を維持しつつ、耐病性を付加した系統を作出するために培養変異を利用することが有効と考えた。本手法を利用するためには、変異を誘発すると考えられるカルスを經由し、再分化する培養系が必須となる。Toyoda ら²²⁾は、イチゴ萎黄病耐病性個体選抜にあたり、罹病性品種宝交早生由来の再分化個体 1225 個体より耐病性個体 2 個体を選抜している。また、高橋¹⁹⁾は、イチゴ黒斑病耐病性個体選抜にあたり、罹病性品種盛岡 16 号由来の再分化個体 1196 個体より耐病性個体 3 個体を選抜している。このように、培養変異の変異誘発頻度は、非常に低いことが想定されることから、多数の再分化個体を効率的に作出する技術が必要である。しかし、とちおとめを用いた例はない。以下に、とちおとめの再分化培養系の検討を行い、効率的なカルス誘導および再分化条件を確立したので報告する。

材料および試験方法

1. 多芽体由来培養植物の育成

供試材料として、とちおとめおよび女峰の多芽体由来培養植物を育成した。多芽体由来培養植物は、ランナー先端部を 70%エタノールで 30 秒間、0.5%次亜塩素酸ナトリウムで 10 分間表面殺菌後、滅菌水で 3 回洗浄し、0.5 ~ 1.0 mm の大きさで生長点を摘出した。その後、高野ら²⁰⁾の報告をもとに MS¹³⁾培地の無機塩組成を 2 倍に希釈した 1/2MS 培地にベンジルアデニン (BA) 0.2mg/l、ポリビニルピロリドン (PVP) 500mg/l、シヨ糖 2%、寒天 8g/l を添加した培地に置床して培養した。

生存個体は、MS 培地にシヨ糖 3%、寒天 8g/l、BA 0.125mg/l、カイネチン (KIN) 0.25mg/l を含む増殖培地¹⁵⁾で無菌的に継代した。培養条件は、20℃、光強度 40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{sec}^{-1}$ 、12 時間日長とした。なお、本報告で供試

した培地はすべて pH5.7 に調整した。

2. 葉片培養法における再分化条件の検討

1) カルス培養時の処理条件の検討

とちおとめ多芽体由来培養植物を供試した。外植体は、小葉を約 5 mm 角に調製した。外植体は、2.0ml/枚の前処理培地⁵⁾(MS, 2,4-D 0.2mg/l, BA 1.0mg/l, シヨ糖 3%) に 25℃、暗黒、100rpm の条件で 1 日間浸漬処理した。前処理時にフェノール様物質を除去する目的で PVP 添加 (500mg/l) の影響について検討した。

次にカルス培養における基本培地 (MS, 1/3MS, NN¹⁴⁾) およびサイトカイニン種 (BA, チジアズロン (TDZ)) とその濃度 (1.0, 2.0mg/l) について検討した。オーキシンは、2,4-D 0.1mg/l をそれぞれ供試培地に添加した。MS はイチゴの再分化に一般的に用いられていることから^{5, 17)}、1/3MS は窒素成分を低減させた培地として、および NN は穀物の再分化に用いられていることからそれぞれ用いた。BA は、国内品種で一般的に用いられていることから^{5, 23)}、TDZ は海外品種で報告¹⁷⁾があることからそれぞれ用いた。それぞれ供試培地は、20 × 95 mm の平底試験管に 10ml ずつ分注後、オートクレーブした。1/3MS 培地は、MS 成分の KNO₃, NH₄NO₃ および KH₂PO₄ を 1/3 に改変した。再分化誘導は、MS 培地にシヨ糖 30g/l、寒天 8g/l ならびに BA 2.0mg/l を添加した培地⁴⁾を用い、葉片置床 60 日後に移植した。

培養条件は、カルス誘導時の光強度が 7 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{sec}^{-1}$ 、再分化誘導時は光強度 40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{sec}^{-1}$ とし 16 時間日長、25℃ で管理した。葉片置床 40 日後にカルス形成率、90 日後に再分化率を調査した。

2) 再分化誘導時に添加する TDZ 濃度の検討

供試材料、外植体の調製および前処理は、1) と同様に行った。ただし、前処理時の PVP は無添加とした。カルス培養は、1) で最も再分化率の高かった 1/3MS 培地に、シヨ糖 30g/l、寒天 8g/l ならびに TDZ 1.0mg/l および 2,4-D 0.1mg/l を添加した培地を用いた。再分化培地は、MS 培地に、シヨ糖 30g/l、寒天 8g/l およびカルス培養時に添加した TDZ を再分化誘導に使用する 1.0, 2.0, 4.0mg/l の 3 水準で添加した。対照として、1) で使用した BA 2.0mg/l を添加した培地を用いた。供試培地は、20 × 95 mm の平底試験管に 10ml ずつ分注後、オートクレーブした。

培養条件は、1) と同様とした。葉片置床 120 日後に再分化率を調査した。

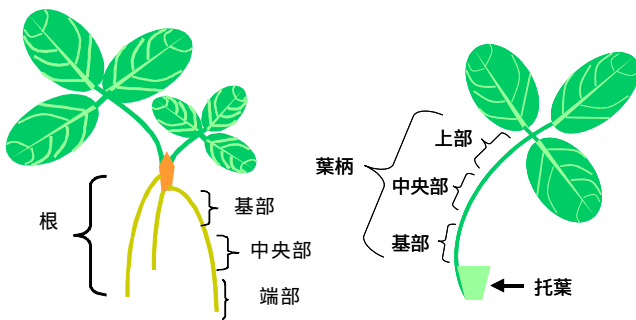
3) 供試組織の違いがカルス形成および再分化に及ぼす影響の検討

供試材料は、とちおとめ多芽体由来培養植物を用い、対照として女峰を用いた。外植体は、多芽体由来培養植

物を植物生長調節物質の含まない MS 培地で 1 ヶ月程度培養した個体より摘出した。多芽体由来培養植物を植物生長調節物質外植体の調製および供試部位は、第 1 表および第 1 図に示した。前処理は、外植体を前処理培地 (1/3MS, 2,4-D 0.1mg/l, TDZ 1.0mg/l, ショ糖 3%) に 25℃, 暗黒, 30rpm の条件で 1 日間浸漬処理した。カルス誘導は、1) で最も再分化率の高かった 1/3MS 培地に、ショ糖 30g/l 寒天 8g/l ならびに TDZ 1.0mg/l および 2,4-D 0.1mg/l を添加した培地を用いた。再分化誘導は、2) で再分化率の最も高かった MS 培地にショ糖 30g/l, 寒天 8g/l ならびに TDZ 1.0mg/l を添加した培地を用いた。各供試培地は、オートクレーブ後、滅菌シャーレ (90 × 20 mm) に 40ml ずつ分注した。培養条件は 1) と同様にした。葉片置床 30 日後にカルス形成率、60 日後に再分化率を調査した。

第 1 表 イチゴ供試組織および外植体の大きさ

供試組織	外植体の大きさ
葉身 (最上位葉および次葉)	5mm角
" (最下位葉および次葉)	5mm角
葉柄 (上部)	10mm長
" (中央部)	10mm長
" (基部)	10mm長
根 (端部)	10mm長
" (中央部)	10mm長
" (基部)	10mm長



第 1 図 外植体として供試されたイチゴ組織

3. 薬培養法における再分化条件の検討

供試材料は、ガラス温室内で育成されたとちおとめ養液栽培苗を用いた。直径 4~5 mm の蕾を採取し、1% 次亜塩素酸ナトリウムで 10 分間表面殺菌、滅菌水で 3 回洗浄後、実体顕微鏡下で薬 (花粉ステージ: 1 核期) を摘出した。カルス誘導および再分化誘導は、森下ら¹¹⁾の報告をもとに LS 培地に、ゲランガム 3g/l, BA 2.0mg/l, NAA 0.02 mg/l およびショ糖を 3.0g/l に改変した培地を用いた。

培地は、オートクレーブ後、滅菌シャーレ (90 × 20 mm) に 40ml ずつ分注した。培養条件は、カルス誘導時の光強度を $40\mu\text{mol m}^{-2}\text{sec}^{-1}$ とし 16 時間日長 25℃ で管理した。規模は、大沢ら⁶⁾の方法により 1 シャーレあたり 9 外植体 (薬 3 個/外植体) で行った。

調査は、置床 110 日後にカルス形成外植体数および再分化外植体数を調査した。また、連続的に不定芽を誘導するために、得られたカルスを経時的に同一培地に継代し得られた不定芽数を調査した。

4. フローサイトメーターによる再分化個体の倍数性調査

供試材料は、とちおとめ薬由来および葉片由来再分化個体を用い、内部標準として水稻を用いて倍数性変異を調査した。

各供試材料と内部標準の葉身 (それぞれ約 0.25 cm^2) は、DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 濃度を 2.0mg/l に改変した DAPI 染色液¹²⁾を数滴加えて細かく切り刻んだ後、さらに 2.0ml の DAPI 染色液を加えて 5 分間放置した。その後、 $50\mu\text{m}$ のメッシュでろ過し、DNA の蛍光強度をフローサイトメーター (partec 社 PA) で測定した。

各系統の相対的蛍光強度は、内部標準との相対値で示した。さらに、対照であるとちおとめの相対的蛍光強度と比較し、その結果から倍数性を推定した。

結果

1. 葉片培養法における再分化条件の検討

1) カルス誘導時の処理条件の検討

前処理での PVP 添加の効果を検討した結果、MS, 1/3MS, NN いずれの基本培地でも PVP 無添加が添加と比較して再分化率が高かった (第 2 表)。よって、これ以降の前処理は PVP 無添加とした。

PVP による前処理の有無にかかわらずカルス形成率は、すべての基本培地において BA 添加区が TDZ 添加区と比較して低かった。また、再分化率は PVP 無添加で前処理し、サイトカニンとして TDZ を 1.0mg/l 添加した 1/3MS 培地で 34.3% と最も高かった。次いで、TDZ を 2.0mg/l 添加した MS および 1/3MS 培地が、それぞれ 26.5% と高かった。NN 培地の再分化率は、TDZ を 2.0mg/l 添加した区が最も高く 8.6% であり、MS および 1/3MS 培地と比較して劣る結果であった (第 2 表)。これらから、基本培地は 1/3MS とし TDZ を 1.0mg/l および 2,4-D を 0.1mg/l 添加する培地を採用した。

2)再分化誘導時に添加する TDZ 濃度の検討

TDZ 添加区の再分化率 (15.0~35.0%) は, 対照の BA 添加区 (10.0%) に比較して高かった。また, TDZ の添加濃度は, 低くなるほど再分化率が向上し, 1.0mg/l で最も高く 35.0% であった (第 3 表)。よって, 再分化培地の TDZ 添加濃度は 1.0mg/l とした。

3) 供試組織の違いがカルス形成および再分化に及ぼす影響の検討

とちおとめのカルス形成率は, 葉身を用いた場合に, 100% (最上位葉および次葉), 97.0% (最下位葉および次葉) であり, 葉柄 (76.2~85.6%) および根 (55.8~91.5%) に比較して高かった。また, 葉柄および根では, それぞれ基部においてカルス形成率が高く, 先端に向かって低下した。再分化率は, 葉身最上位葉および次葉を用いた場合に 15.3% であり, 最下位葉および次葉 (4.0%), 葉柄 (9.5~2.2%) および根 (0%) に比較して高かった。また, 葉柄の再分化率は, 基部から上部に向かって上昇する傾向が見られ, カルス形成率と異なる傾向を示した。対照の女峰の再分化率は, とちおとめと比較して全ての区において高かった (第 4 表)。これらから, とちおとめの再分化に供試する部位は, 最上位葉および次葉の葉身が最適で, 次いで葉柄の上部, 中央部が望ましく, 最下位葉および次葉の葉身および葉柄の基部は劣った。また, 根は適さなかった。

2. 薬培養法における再分化条件の検討

カルス形成率は, 置床 110 日後で 88.9% であり, そのほとんどは緑色カルス (GC) であった。再分化率は, 70.4% であった (第 5 表)。GC からの不定芽は, 培養を 8 ヶ月間行うことにより合計 195 芽得られた。褐変カルス (BC) からの不定芽形成は 1 芽のみであり, 再分化には GC が適していた。

不定芽は, 3 回の継代までに連続的に不定芽が形成されたが, それ以降はカルスの褐変が進行して得られなかった。また, 不定芽数はカルスにより産生能に差がみられ, 最高で 19 芽であり, 最低で 1 芽であった (第 6 表)。

3. フローサイトメーターによる再分化個体の倍数性調査

葉片培養による再分化個体は, フローサイトメーターによる倍数性調査によりすべて 8 倍体と推定された。薬培養由来の再分化個体は, 75 個体中 71 個体が 8 倍体, 残り 4 個体が 16 倍体と推定された (第 7 表, 第 2 図)。

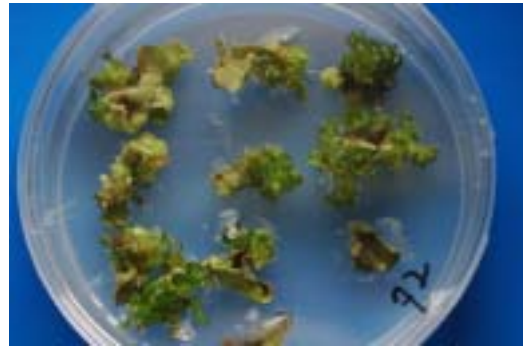


写真 1 とちおとめ葉片からの再分化状況 (葉片培養 60 日後)



写真 2 とちおとめ葉柄からのカルス形成および再分化状況 (葉柄置床 60 日後)



写真 3 とちおとめ再分化個体の発根状況 (発根培養 30 日後)

第2表 イチゴ品種とちおとめ葉片を用いたカルス形成,再分化に及ぼすPVP,基本培地およびサイトカイニン種の影響

前処理時のPVP添加	基本培地	添加サイトカイニン		供試葉片数	カルス形成		再分化		
		種類	濃度(ml/l)		葉片数	率(%)	葉片数	率(%)	
無	MS	BA	1.0	32	14	43.8	4	12.5	
		TDZ	1.0	32	32	100.0	3	9.4	
		TDZ	2.0	34	34	100.0	9	26.5	
	1/3MS	BA	1.0	34	14	41.2	2	5.9	
		TDZ	1.0	35	34	97.1	12	34.3	
		TDZ	2.0	34	29	85.3	9	26.5	
	NN	BA	1.0	36	32	88.9	2	5.6	
		TDZ	1.0	35	33	94.3	1	2.9	
		TDZ	2.0	35	34	97.1	3	8.6	
	有	MS	BA	1.0	19	15	78.9	0	0.0
			TDZ	1.0	20	15	75.0	0	0.0
			TDZ	2.0	22	22	100.0	2	9.1
1/3MS		BA	1.0	22	20	90.9	1	4.5	
		TDZ	1.0	22	22	100.0	0	0.0	
		TDZ	2.0	21	20	95.2	4	19.0	
NN		BA	1.0	35	29	82.9	1	2.9	
		TDZ	1.0	39	34	87.2	0	0.0	
		TDZ	2.0	35	30	85.7	4	11.4	

注1.カルス形成は置床40日後に観察.
 2.置床60日後に,2.0mg/lのBAを添加したMS培地に移植し,再分化を誘導した.
 3.再分化は置床90日後に調査.ただし,茎葉分化が不完全なものも含めた.

第3表 イチゴ品種とちおとめ再分化に及ぼす再分化培地中のサイトカイニン濃度の影響

サイトカイニン	濃度(mg/l)	供試カルス数	再分化葉片数	再分化率(%)
TDZ	1.0	20	7	35.0
	2.0	20	5	25.0
	4.0	20	3	15.0
(対照)				
BA	2.0	20	2	10.0

注.調査は葉片置床120日後に調査した.

第4表 イチゴ培養苗供試組織の差異によるカルス形成および再分化状況

品種	供試組織	供試葉片数	カルス形成		再分化		
			葉片数	率(%)	葉片数	率(%)	
とちおとめ	葉身	最上位葉および次葉	98	98	100.0	15	15.3
		最下位葉および次葉	99	96	97.0	4	4.0
		上部	105	80	76.2	10	9.5
	葉柄	中央部	112	86	76.8	8	7.1
		基部	90	77	85.6	2	2.2
		端部	43	24	55.8	0	0.0
	根	中央部	45	35	77.8	0	0.0
		基部	47	43	91.5	0	0.0
		端部	43	24	55.8	0	0.0
女峰	葉身	最上位葉および次葉	100	92	92.0	77	77.0
		最下位葉および次葉	93	69	74.2	78	83.9
		上部	160	142	88.8	80	50.0
	葉柄	中央部	133	110	82.7	52	39.1
		基部	156	132	84.6	57	36.5
		端部	37	20	54.1	4	10.8
	根	中央部	58	7	12.1	2	3.4
		基部	61	8	13.1	0	0.0
		端部	37	20	54.1	4	10.8

注1.カルス形成葉片数は,外植体置床30日後に調査した.
 2.再分化カルス数は,外植体置床60日後に調査した.
 3.再分化率は,供試数に対する再分化したカルス数の割合

第5表 イチゴ品種とちおとめ薬からのカルス形成および再分化結果

基本培地	BA(mg/l)	NAA(mg/l)	供試 外植体数	カルス形成		再分化	
				外植体数	率(%)	外植体数	率(%)
LS	2.0	0.02	54	48	88.9	38	70.4

注. カルス形成および再分化は置床110日後に調査した.

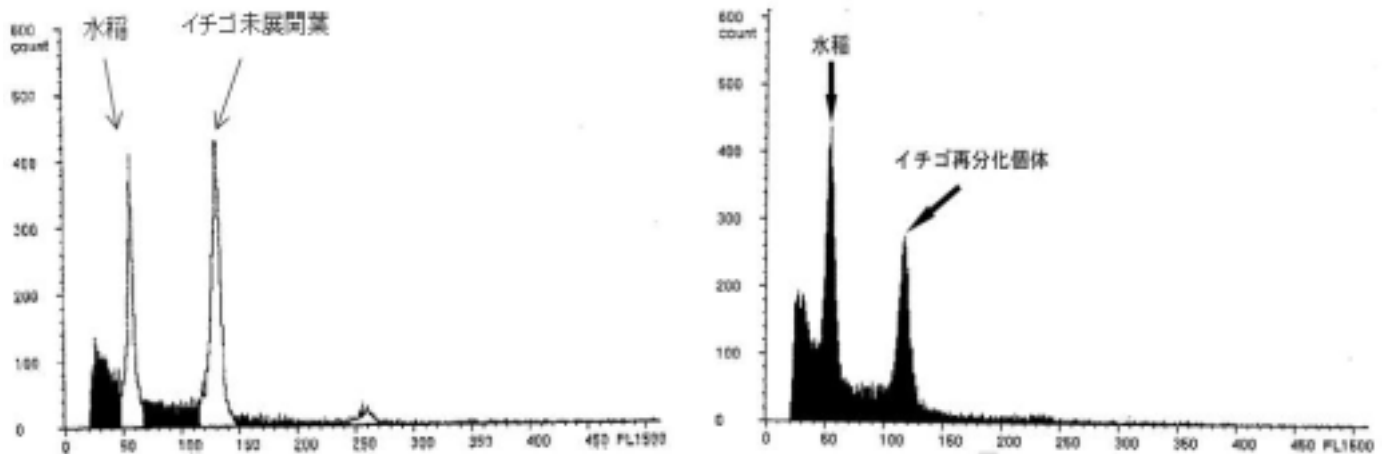
第6表 イチゴ品種とちおとめ薬由来カルス性状が不定芽形成数に及ぼす影響

カルス性状	供試 カルス数	不定芽形成数				不定芽数/カルス
		継代1	継代2	継代3	合計	
緑色カルス	45	72	90	33	195	1~19
褐変カルス	3	0	0	1	1	0~1

注. 培養は平成16年5月24日に薬を置床し, 9月14日(継代1), 11月22日(継代2)および1月28日(継代3)の3回継代を行った.

第7表 イチゴ品種とちおとめ再分化個体の倍数性に及ぼす培養法の差異

培養法	供試再分 化個体数	推定倍数性			
		8x	(%)	16x	(%)
葉片培養	25	25	100	0	0
薬培養	75	71	94.6	4	5.3



第2図 フローサイトメーターによるイチゴ未展開葉(とちおとめ), イチゴ再分化個体葉の蛍光強度分布

注. サンプルの相対的蛍光強度(右)/対照の平均相対的蛍光強度の値(左)が, 0.9~1.1以内であれば8倍体とみなした.

考 察

効率的な再分化培養系の確立は、培養変異を利用するために必要不可欠である。一般的に、イチゴの再分化能には、品種間差異があることが知られており、遺伝的要因が関与していることが想定されている¹⁷⁾。荒井ら⁵⁾は、イチゴ葉片を褐変させ再分化の妨げの主因と考えられる誘導性フェノール物質を除去する目的で、カルス誘導を行う前に液体培地による前培養を行っている。また天谷ら²⁾は、デルフィニウムが代謝する黒褐色物質の障害を回避するために、増殖培地に PVP を添加することにより、植物体の活性を保ちながら培養することに成功している。そこで本報告では、PVP を前培養時に添加することによりその効果を検討した。しかし、添加の効果は認められなかった。葉片中に残存した本物質が再分化時に必要な植物生長調節物質を吸着したため、再分化が低下したものと考えられる。置床前にカルス誘導培地で葉片に付着した PVP を洗浄するなどの工夫が必要である。

とちおとめの最適なカルス誘導および再分化条件は、最上位葉および次葉の葉身を外植体とし、1/3MS を基本にシヨ糖 30g/l、TDZ 1.0mg/l および 2,4-D 0.1mg/l を添加した培地でカルス誘導を行い、MS を基本にシヨ糖 30g/l および TDZ 1.0mg/l を添加した培地で再分化誘導することであった。カルス誘導時の基本培地は、1/3MS を採用した。高山ら²¹⁾は、イチゴのジャファメーターによる大量増殖試験で、MS 基本培地の NH_4NO_3 、 KNO_3 および CaCl_2 成分を段階的に希釈して培養したところ、2倍希釈した 1/2MS 培地が最も効率的に増殖したと報告している。MS はナス科植物の培養のために開発された培地であり、イチゴにとっては栄養過剰の可能性も考えられる。

再分化培養個体は、容易に発根培地（1/2MS 培地）で発根し、パーミキュライトを用いて人工気象室内で順化することにより得られる。

Toyoda ら²³⁾は、イチゴランナーの若い展開葉を外植体として用いて再分化個体を作成しているが、供試時期がランナー発生時期に限定されてしまうという欠点がある。また、アンチホルミンや 70%エタノールなどの滅菌操作による外植体のダメージも考えられる。大塚ら³⁾は、キクのプロトプラスト培養において無菌培養植物を利用することにより、植物体を育成することに成功している。材料に無菌培養植物を用いることは優れた方法と思われた。本報告では、供試材料として無菌培養植物の葉片を利用することにより、年間を通してとちおとめから再分化順化苗を得ることが可能になった。

とちおとめ再分化に関する試験は、これまでにも行われてきたが、再分化個体は得られていない（平成 10 年度野菜試験成績書 p 14）。本報告では、前培養およびサイトカイニンとして TDZ を使用することにより、葉片からの再分化率を向上することができた。また、本培養法は女峰においても高い再分化率が得られ、本県育成の他品種にも適用できるものと考えられる。

再分化個体は、高次倍数性の変異が出現することが多くの作物で報告されている¹⁶⁾。本報告においても森下ら¹¹⁾の報告と同様に薬培養由来の再分化個体からフローサイトメーターによる倍数性調査により倍数性変異個体が出現した。よって、再分化個体については倍数性変異が出現する可能性があるため倍数性調査を行う必要があると考えられる。これまで、イチゴの倍数性調査は、根端組織を用いた染色体観察法やフローサイトメーターを用いた場合でも夾雑物が少ないと考えられる花弁組織を材料にして行われてきた。しかし、三柴らの DAPI 染色液¹²⁾を使用することにより熟練を要する染色体観察や開花を待たずに早期に調査可能になった。

とちおとめ薬培養法の再分化率は、高率であったことから材料の採取時期が開花時期に限定されるものの、葉片培養法との併用が可能であると考えられた。また、葉片培養法は、女峰に比較して再分化率が低い、新しい突然変異原として注目されているイオンビーム¹⁾と併用することにより、効率的に変異個体を作成することができると考えられる。今後は、葉片へのイオンビーム照射条件の検討および再分化率向上のさらなる向上のために培養条件を検討していきたいと考えている。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導頂いた石川成寿環境技術部長（前生物工学部長）、葉片培養法について貴重なご意見を頂いた奈良県農業技術センター浅尾浩史博士に心より感謝する。また、臨時職員手塚依子氏には作業補助として多大なるご協力いただいた。ここに記して感謝の意を表す。

引用文献

1. 阿部知子・鈴木賢一 (2002) 重イオン変異育種の可能性．農業および園芸 77 : 580-586
2. 天谷正行・岡部陽一・米内貞夫 (1992) デルフィニウムの組織培養による大量増殖．栃木農試研報 39 : 43-52
3. 大塚寿夫・末松信彦・戸田幹彦 (1985) キクのプロトプラスト培養と植物体再分化．静岡農試研報 30 : 25 - 33
4. 浅尾浩史・荒井 滋・佐藤隆徳・平井正志・日比忠明 (1994) *Agrobacterium tumefaciens* によるイチゴ形質転換体の作出．植物組織培養 11 : 19-25
5. 荒井滋・浅尾浩史 (1993) イチゴ葉組織からのカルス誘導と植物体再生．奈良農試研報 24 : 19 - 24
6. 大沢勝次・戸田幹彦・西 貞夫 (1974) やく培養の利用に関する研究．イチゴやく培養によるウイルスフリー株の大量育成．野菜試報告．A1 : 41-57
7. 岡本康博・藤井新太郎・加藤喜重郎・芳岡昭夫 (1970) イチゴの新病害「萎黄病」について．日植病報 36 : 166
8. Dan, Y., Stephens, C. (1995) The Development of Asparagus Somaclones with high levels resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Asparagi* and *F.proliferatum*. Plant Disease 79:923-927
9. Heath-Pagliuso, S., Pullman, J., and Rappaport, L. (1988) Somaclonal variation in celery: screening for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii*. Theor Appl Genet. 75:446-451
10. 石原良行・高野邦治・植木正明・栃木博美 (1996) イチゴ新品種「とちおとめ」の育成．栃木農試研報 44 : 109-123
11. 森下昌三・山川理 (1990) イチゴの薬培養における再分化個体の変異．園学雑 59 (別 1) : 420 - 421
12. 三柴啓一郎・安藤敏夫・三井正洋・渡辺 均・国分尚 (1999) ペチュニア属 53 分類群の各 DNA の比較．育種学研究 1 (別 1) : 166
13. Murashige, T., and Skoog, F. (1962) A reversed medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497
14. Nitch, JP., and Nitch, C. (1969) Haploid plants from pollen grains. Science 163:85-87
15. 岡田恵子・荒井 滋・浅尾浩史 (2003) イチゴ増殖苗の及ぼすサイトカイニンの影響．奈良農技セ研報 34 : 15 - 24
16. 小倉久和 (1983) 植物組織培養と染色体変異 (1).
- 農業および園芸 58 : 1465 - 1467
17. Passey, A., Barrette, K., James, D. (2003) Adventitious shoot regeneration from seven commercial strawberry cultivars. (*Fragaria x ananassa* Duch.) using a range of explant types. Plant Cell Rep. 21:397-401.
18. Ruthkowska-Krause, I., Mankowska, G., Lukaszewicz, M. (2003) Regeneration of flax (*Linum usitatissimum* L.) plants from anther culture and somatic tissue with increased resistance to *Fusarium oxysporum*. Plant Cell Rep. 22:110-116
19. 高橋春實 (1993) イチゴの黒斑病抵抗性株の育成に関する研究．秋田県農業短期大学研究報告 19 : 1-44
20. 高野邦治・赤木 博 (1988) 茎頂培養によるイチゴの大量増殖法．農業および園芸 63 : 159 - 162
21. 高山真策・滝沢直子 (2004) 組織培養によるイチゴシュートの生育に及ぼす培養条件の影響．植物工場学会誌 16 : 209 - 214
22. Toyoda, H., Horikoshi, K., Yamano, Y., and Ouchi, S. (1991) Selection for *Fusarium* wilt disease resistance from regenerants derived from leaf callus of strawberry. Plant Cell Rep. 10:167-170
23. Toyoda, H., Horikoshi, K., Inaba, K., and Ouchi, S. (1990) Plant regeneration of callus tissues induced from leaf explants of strawberry. Plant Tissue Culture Letters 7 : 38-41