

ナス台木ヒラナスにおける小孢子からの植物体の再生

高田衣子*・佐伯由美・平島敬太・中原隆夫

ナス台木における青枯病抵抗性等の優良品種の育種期間を短縮するため、ヒラナスの小孢子を培養して植物体を再生させる技術を確認した。効率的にカルス形成を誘導するには、4～7 mm程度の花蕾から小孢子を単離し、滅菌水中で35℃、4日間処理して、多量要素を1/2量とし、シヨ糖 20 g/l、NAA 0.5 mg/lおよびBA 0.5 mg/lを添加したNitsch&Nitsch培地に、小孢子的密度 5×10^5 /mlで行う培養条件が適していた。形成されたカルスを、シヨ糖 20 g/l、IAA 0.2 mg/l、Zeatin 4 mg/lおよび寒天 8 g/lを添加したMS培地で培養するとシュートが再生し、フロリアライトを利用して発根させることで、倍加半数体を含む多数の再生植物が得られた。

[キーワード：小孢子培養、植物体再生、ナス台木、倍加半数体、半数体、ヒラナス]

Plant regeneration in *Solanum integrifolium* microspores culture. TAKATA Kinuko, Yumi SAIKI, Keita HIRASHIMA and Takao NAKAHARA

(Fukuoka Agricultural Research Center, Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan) *Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent.* 25: 23-28 (2006)

In order to shorten the breeding term of eggplant rootstock, we established the technique to regenerate through callus from microspores in *Solanum integrifolium*. For the efficient callus induction, microspores were isolated from 4-7 mm length of flower buds and prepared in sterilized water at 35 °C for 4 days before the microspore culture. After the treatment, calli were induced from the microspores in Nitsch & Nitsch medium with half strength of macronutrient, 20 g/l sucrose, 0.5 mg/l NAA and 0.5 mg/l BA at a microspore density of 1×10^5 /ml. For the shoot formation, the calli were transferred to MS medium containing 20 g/l sucrose, 0.2 mg/l IAA, 4 mg/l zeatin and 8 g/l agar. Subsequently, rooting from the shoots facilitated in Florialite. As a result, many regenerated plants containing doubled haploids were obtained.

[Key words : doubled haploid, eggplant rootstock, haploid, microspore, plant regeneration, *Solanum integrifolium*]

緒 言

ナスは本県の野菜のなかで、生産額が2番目に多く、重要な作物のひとつであるナスの重要な病害のひとつである青枯病は土壌伝染性で、*Ralstonia solanasearum* の感染によって夏期の高温条件で多発する。本病は施設栽培の拡大や温暖化の進行により、被害が拡大して大きな問題となっている。その対策として、これまで台木として広く用いられてきたヒラナス (*Solanum integrifolium*) にかわって、青枯病に抵抗性を持つ‘トレロ’や‘台太郎’などが年々増えている。しかし、これらの抵抗性の台木品種は、接木後の樹勢管理が難しく、低温期の果実肥大が劣る^{3,10)}。このため、青枯病抵抗性に加えて栽培特性にも優れた台木品種の早期育成が望まれている。

ナス台木の育種は主に交雑育種により行われている。しかし、交雑育種は目的の形質を固定するために自殖や戻し交配を繰り返す必要があり、育種に長期間を要する。一方、半数体の倍加個体が得られれば、形質が遺伝的に固定しているため、短期間で育種を進めることができ、望まれる品種を早期に育成できる。

半数体育種法としては、薬培養、小孢子培養および胚培養等があり、ナス^{5,6,8,16,20,21)}、アブラナ科植物^{9,12,15)}およびイネ¹⁴⁾等の育種に利用されている。このうち、小孢子培養は、一度に多数の細胞を獲得して培養に供試する

ことができ、また、薬壁の体細胞由来の再生植物を回避できることから、多数の純系植物が獲得できる。さらに、小孢子は $\phi 20 \mu\text{m}$ 前後の単細胞であることから、到達深度が1mm程度であるイオンビーム¹⁷⁾等の変異原を確実に照射することができ、薬や他の器官に比べて変異が固定された再生植物の獲得が期待できる。したがって、ナス台木においても小孢子培養が確立できれば、多数の再生植物から青枯病抵抗性等の優良形質を持つ品種の育成を短期間かつ効率的に進めることが可能になるものと考えられる。しかし、ナス属における小孢子培養についての報告は三吉ら⁸⁾による栽培ナス (*S.melongena*) のみで、ナス台木ではない。また、ヒロシマナ (*Brassica campestris*) の小孢子培養¹²⁾では、不定胚形成に品種間差異が認められることから、ナス属においても種間ならびに品種間差異があることも考えられる。このため、ナス台木の小孢子培養についての検討も必要であると考えられる。

そこで本研究では、ナス台木の優良品種を早期に育成することを目的に、ヒラナスの小孢子から植物体を再生させる技術について検討した。

材料及び方法

1 小孢子的単離

供試材料として、ガラス温室内 (昼温23℃/10時間、夜温17℃/14時間) で栽培したナス台木のヒラナス (タキイ種苗) の花蕾を用いた。培養に最適な生育ステージの小孢子を含む花蕾の大きさを検討するため、花蕾

*連絡責任者 (バイオテクノロジー部)

を4mm未満、4～7mmおよび7mm以上の3つに区分した。花蕾を有効塩素濃度1%の次亜塩素酸ナトリウム水溶液で10分間表面殺菌したのち、滅菌水で1分間ずつ3回洗浄した。花蕾から摘出した葯を、注射筒を用いて滅菌水中でつぶし、50 μ mのナイロンメッシュでろ過後、ろ液を200 \times g、3分間遠心して小胞子を沈殿させた。単離した小胞子は花蕾の大きさごとに区分し、それぞれ多量要素を2分の1量としたNitsch & Nitsch培地(1/2NN)¹³⁾ 4mlに懸濁した後、 ϕ 35mmのシャーレに2mlずつ分注し、2反復とした。

また、葯壁等の体細胞組織やカルス形成能を持たない小胞子を除去するため、ナイロンメッシュでろ過後沈殿させた小胞子を、15ml遠沈管に40%、60%および80%のパーコール溶液をそれぞれ2mlずつ重層した密度勾配層に加え、150 \times gで5分間遠心し、それぞれの境界層に分離したものを採取した。単離した小胞子は境界層ごとに区分し、それぞれ多量要素を2分の1量としたNitsch & Nitsch培地(1/2NN)¹³⁾に懸濁した後、 ϕ 35mmのシャーレに2mlずつ分注した。

いずれの検討ともに培養は25 $^{\circ}$ C、暗黒条件下で行い、4週間後にカルスの数を調査した。

2 小胞子からのカルス形成

単離した小胞子を液体培地で培養する前の滅菌水処理の日数について検討した。処理中の糖濃度と温度は予備試験の結果から、それぞれショ糖2%、35 $^{\circ}$ Cとした。処理日数は0、1、4および7日間の4試験区を設け、暗黒条件で行った。各区ともシャーレに1.5mlずつ分注し、3反復とした。小胞子は200 \times gで3分間遠心して沈殿させ、トーマの血球計算盤で数を測定し、2 \times 10⁵/mlの密度に調整した。

次に、培養に適した基本培地と小胞子の培養密度について検討した。基本培地は、1/2NN培地¹³⁾、改変NLN培地⁸⁾、NN67培地⁶⁾、KM8p培地²⁾、Ogawaらの培地¹⁴⁾および多量要素を2分の1量としたMS培地¹¹⁾(1/2MS)の6種類を用いた。それぞれの培地はショ糖20g/l、NAA 0.5 mg/lおよびBA 0.5 mg/lを添加し、pH6.0に調整後ろ過滅菌した。これらの培地に小胞子を1 \times 10⁵/mlの密度で懸濁して ϕ 35mmのプラスチックシャーレに1mlずつ分注して培養し、2反復とした。また、小胞子の培養密度は1 \times 10⁴、1 \times 10⁵、5 \times 10⁵および1 \times 10⁶/mlの4段階について、1/2NN培地で懸濁して、それぞれ ϕ 35mmのプラスチックシャーレに1mlずつ分注して培養し、3反復とした。

第1表 ヒラナスの小胞子培養における花蕾の大きさと小胞子由来のカルス形成数

| 花蕾の大きさ(mm) | 供試葯数(シャーレ当たり) | カルス形成数(シャーレ当たり) | カルス形成率(葯当たり) |
|------------|---------------|-----------------|--------------|
| ～4 | 60 | 0.5 | 0.008 |
| 4～7 | 54 | 35.0 | 0.648 |
| 7～ | 48 | 12.0 | 0.250 |

1) 平均値、2反復

2) 1/2NN培地(ショ糖20g/l、NAA 0.5 mg/l、BA 0.5 mg/l)、2ml/シャーレで培養し、四週間後に調査

いずれの検討ともに培養は25 $^{\circ}$ C、暗黒条件下で行い、4週間後にカルスの数を調査した。

3 植物体の再生

カルスはシュートが形成されるまで再生培地¹⁾で、25 $^{\circ}$ C、6000luxの16時間照明条件下で3週間間隔で継代した。この再生培地には、ショ糖20g/l、IAA 0.2 mg/l、Zeatin 4 mg/lおよび寒天8g/lを添加し、pH 5.8に調整して121 $^{\circ}$ Cで15分間オートクレーブした後、 ϕ 90mmシャーレに約20mlずつ分注したMS培地を用いた。

1.5～2cmに伸長したシュートは発根培地に挿し、25 $^{\circ}$ C、6000luxの16時間照明条件下で培養して発根させた。発根培地は、1) 多量要素を1/2量とし、ショ糖20g/lを添加し、pH5.8に調整したMS(1/2MS)液体培地を含ませた2.5 \times 2.5 \times 2.0cmのフロリアライト(サンエイ)および2) 滅菌水を含ませたフロリアライトの2種類を用い、それぞれについて発根の良否を検討した。培地はすべてオートクレーブ滅菌した。発根までの培養には、9 \times 9 \times 10cmのポリカーボネート製のプラントボックスを使用した。

プラントボックス内で4～5枚展葉した再生植物の葉を約1 \times 1cmの大きさに切り取り、フローサイトメーター¹⁸⁾(Partec, Ploidy Analyser PA型)を用いて倍数性を測定した。

結 果

1 花蕾の大きさがカルス形成に及ぼす影響

ヒラナスの小胞子を単離する際の花蕾の大きさとカルス形成率との関係を第1表に示した。単離した小胞子は、培養してから7日前後に分裂を始め、4週間目には直径1～2mmのカルスに生育した(第3図)。カルス形成率が最も高かった花蕾の大きさは4～7mmで、葯当たりおよそ0.6個であった。これに対し、7mm以上の花蕾は葯当たりおよそ0.2個で、4mm未満の花蕾からはカルスがほとんど形成されなかった。

また、カルス形成率が最も高かった4～7mmの花蕾の外観は、萼片から花弁の先端が見える程度であり、葯の色は黄緑色であった。

4～7mmの花蕾において、パーコールの密度が40%と60%の境界層に分離した小胞子からカルスが多く形成された(第2表)。また、これらの境界層から分離

第2表 ヒラナスの小胞子培養におけるパーコール密度勾配遠心により分離した層別的小胞子由来のカルス形成数

| 供試葯数(反復当り) | 反復数 | カルス形成数 |
|------------|-----|---|
| | | 40/60 ¹⁾ 60/80 ¹⁾ |
| 114 | 1 | 600.0 35.0 |
| 46 | 2 | 31.5 7.5 |

1) 平均値、パーコール密度勾配は40%、60%、80%の3層

2) 4～7mmの花蕾を用いた

3) 1/2NN培地(ショ糖20g/l、NAA 0.5 mg/l、BA 0.5 mg/l)、シャーレ当たり2ml、分離した全ての小胞子を培養し、4週間後に調査

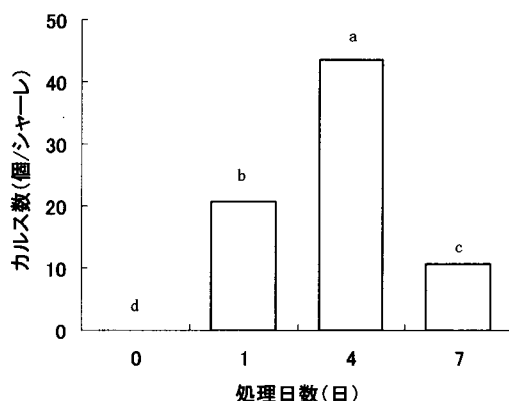
4) 40%と60%の境界層に分離した小胞子由来のカルス

5) 60%と80%の境界層に分離した小胞子由来のカルス

したものは小胞子のみで、薬壁等の体細胞組織は認められなかった (第3図)。

2 小胞子の前処理条件がカルス形成に及ぼす影響

滅菌水中で35℃の温度処理をする期間を検討した結果を第1図に示した。0, 1, 4および7日間の4処理期間のうち、4日処理区のカルス形成数が1シャーレあたり43.5個と最も多く、0日処理区はカルスが全く形成されなかった。



第1図 ヒラナスの小胞子を液体培地で培養する前の処理日数がカルス形成に及ぼす影響

- 1) 平均値, 3反復
- 2) 35℃で処理
- 3) 1/2NN培地 (シヨ糖 20 g/l, NAA 0.5 mg/l, BA 0.5 mg/lを添加) に, 小胞子密度 2×10^5 /ml, シャーレ当たり1.5mlを培養し, 4週間後に調査
- 4) 異英文字間には5%水準で有意差あり (Scheffe's F test)

3 小胞子の培養条件がカルス形成に及ぼす影響

ヒラナスの小胞子培養における基本培地がカルス形成に及ぼす影響を第3表に示した。この中で1/2NN培地はカルス形成数が1シャーレ当たり47個と最も多かった。その一方, MS培地はわずかにカルスが形成されたのみで, その他4種類の培地ではカルスが全く認められなかった。

次に, 小胞子の培養密度がカルス形成に及ぼす影響を第4表に示した。 1×10^5 /ml区でカルス形成率は0.0163%と最も高く, カルス形成数は1シャーレ当たり16.3個であった。 5×10^5 /ml区のカルス形成率も0.0151%と高く, カルス形成数は1シャーレ当たり75.7個, 次の 1×10^6 /ml区, 1×10^4 /ml区の順であった。

4 植物体の再生

ヒラナスのプロトプラスト由来カルスの場合と同じ再生培地¹⁾を用いて, 小胞子由来カルスを培養した結果, カルスはグリーンスポットを形成した。数回の継代後, カルスは不定芽を形成し, 多数のシュートを再生した。(第3図)

第2図に示すように, 2種類の発根培地を比較すると, 1/2MS液体培地を含ませたフロリアライト培地におけるシュートの発根および植物体の生育は順調であった。これに対し, 滅菌水を含ませたフロリアライト培地では, シュートは黄化して健全に生育しなかった。

第3表 ヒラナスの小胞子培養における基本培地がカルス形成に及ぼす影響

| 基本培地 | カルス形成数 (個/シャーレ) | カルス形成率 (%) |
|---------|--------------------|---------------|
| KM8p | 0.0 | 0.0000 |
| 1/2MS | 1.5 | 0.0015 |
| NLN | 0.0 | 0.0000 |
| 1/2NN | 47.0 | 0.0470 |
| NN67 | 0.0 | 0.0000 |
| Ogawa ら | 0.0 | 0.0000 |

- 1) 2シャーレの平均値
- 2) 各培地にシヨ糖 20 g/l, NAA 0.5 mg/l, BA 0.5 mg/lを添加
- 3) 小胞子密度 1×10^5 /ml, シャーレ当たり1 mlを培養し, 4週間後に調査
- 4) カルス形成率は培養小胞子数当たりのカルス形成数で示す

第4表 ヒラナスの小胞子培養における小胞子の培養密度がカルス形成に及ぼす影響

| 培養密度 (/ml) | カルス形成数 (個/シャーレ) | カルス形成率 (%) |
|-----------------|--------------------|---------------|
| 1×10^4 | 0.3 | 0.0033 |
| 1×10^5 | 16.3 | 0.0163 |
| 5×10^5 | 75.7 | 0.0151 |
| 1×10^6 | 107.7 | 0.0108 |

- 1) 3シャーレの平均値
- 2) 1/2NN培地 (シヨ糖 20 g/l, NAA 0.5 mg/l, BA 0.5 mg/lを添加) にそれぞれの密度で懸濁, シャーレ当たり1 mlを培養し, 4週間後に調査
- 3) カルス形成率は培養小胞子数当たりのカルス形成数を示す

5 再生植物の倍数性

小胞子から形成されたカルス84個に由来する再生植物576個体の倍数性について, フローサイトメーターで測定した結果を第5表に示した。再生植物の倍数性は半数体が2.2%, 二倍体が49.3%, 三倍体が32.8%, 四倍体が14.8%および五倍体が0.9%と, 二倍体が最も多く, 次の三倍体であった。

カルス別に見ると, 再生植物が特定の倍数体のみや2~3種の倍数体が混在しているカルスが存在し, 規則性は認められなかった。

考 察

本試験において, まずヒラナス小胞子培養における花蕾の大きさと小胞子由来のカルス形成数について検討した。その結果, 4~7 mmの花蕾から単離した小胞子が培養に適していた。この大きさの花蕾の外観は, 萼片から花卉の先端が見える程度であり, 薬の色は黄緑色であった。このことは, 栽培ナス (*Solanum melongena*) における薬培養^{5,6,16,20,21)} や小胞子培養⁸⁾ に適した花蕾の特徴と一致した。また, 栽培ナスにおいてこれらの培養に



第2図 ヒラナス小孢子培養における発根培地がシュートの生育に及ぼす影響

- 1) 左は1/2MS培地(ショ糖 20 g/l, pH5.8)を含ませたフロリアライト, 右は滅菌水を含ませたフロリアライト
- 2) 発根培地に継代して20日目

適した小孢子は、薬培養や小孢子培養において最も反応しやすいとされる一核期後期～二細胞前期の生育ステージであることが報告されている^{5,8,15,20,21)}。したがって、ヒラナスにおける4～7mmの花蕾には、一核期後期～二細胞前期の小孢子が多く含まれているものと推察される。さらに、ここで示した花蕾の大きさと外観は、ヒラナスの小孢子培養に適した生育ステージを推定する指標として利用できるものと考えられる。

小孢子培養を進めるに当たっては、薬壁等の体細胞組織やカルス形成能を持たない小孢子を効率的に除去することが望ましい。ハクサイにおいて、胚形成能を持つ小孢子を分離するためには、パーコールによる密度勾配分画が有効であることが報告されている¹⁹⁾。本試験において、ヒラナス小孢子をパーコールによる密度勾配分画を行った結果、パーコールの密度が40%と60%の境界層からカルス形成能の高い小孢子を効率よく単離することができ、薬壁等の体細胞組織の混入も認められなかった。このように、ヒラナスの小孢子培養においてもパーコールによる密度勾配分画は有効な操作であることが明らかとなった。

本試験において、ヒラナスの小孢子を単離して直ちに培養した場合、カルスは形成されなかった。そこで、培養前に小孢子を滅菌水中で温度処理をする期間について検討した。ナタネ¹⁵⁾、ハクサイ¹⁹⁾等のアブラナ科植物では、13%の高濃度の糖を添加した培地中で、33℃前後、数日間の処理により、胚様体の形成率が高まる。また、栽培ナスでは小孢子を滅菌水中で35℃、3日間の処理により、カルス形成率が高まることが報告されている⁸⁾。ヒラナスの小孢子培養においても、小孢子的カルス形成能を高めるためには、滅菌水中で35℃、4日間の処理が有効であった。

ヒラナスの小孢子培養には1/2NN培地に適した。そこで、この1/2NN培地を用いて、小孢子的培養密度について検討した。小孢子からのカルス形成率は、培養密度 1×10^5 /mlが最も高く、次に 5×10^5 /mlであった。ヒラナスのプロトプラスト培養¹⁾やハクサイの小孢子培養¹⁹⁾では、細胞ないし小孢子的培養密度が高くなると、カルスや胚様体の形成率が低下することが報告されている。本試験においても、培養密度は 1×10^5 /ml

第5表 小孢子由来のカルスから再生した個体の倍数性

| 倍数性 | 再生個体数 | 割合(%) |
|-----|-------|-------|
| 半数体 | 13 | 2.2 |
| 二倍体 | 284 | 49.3 |
| 三倍体 | 189 | 32.8 |
| 四倍体 | 85 | 14.8 |
| 五倍体 | 5 | 0.9 |
| 計 | 576 | 100.0 |

- 1) 調査したカルスの数は84

より高くなるとともにカルス形成率が低下する傾向が認められた。また、1シャーレ当たりのカルス形成率と形成数を考慮すると、ヒラナスにおける小孢子的培養密度は 1×10^5 /ml～ 1×10^6 /ml程度が適すると考えられる。

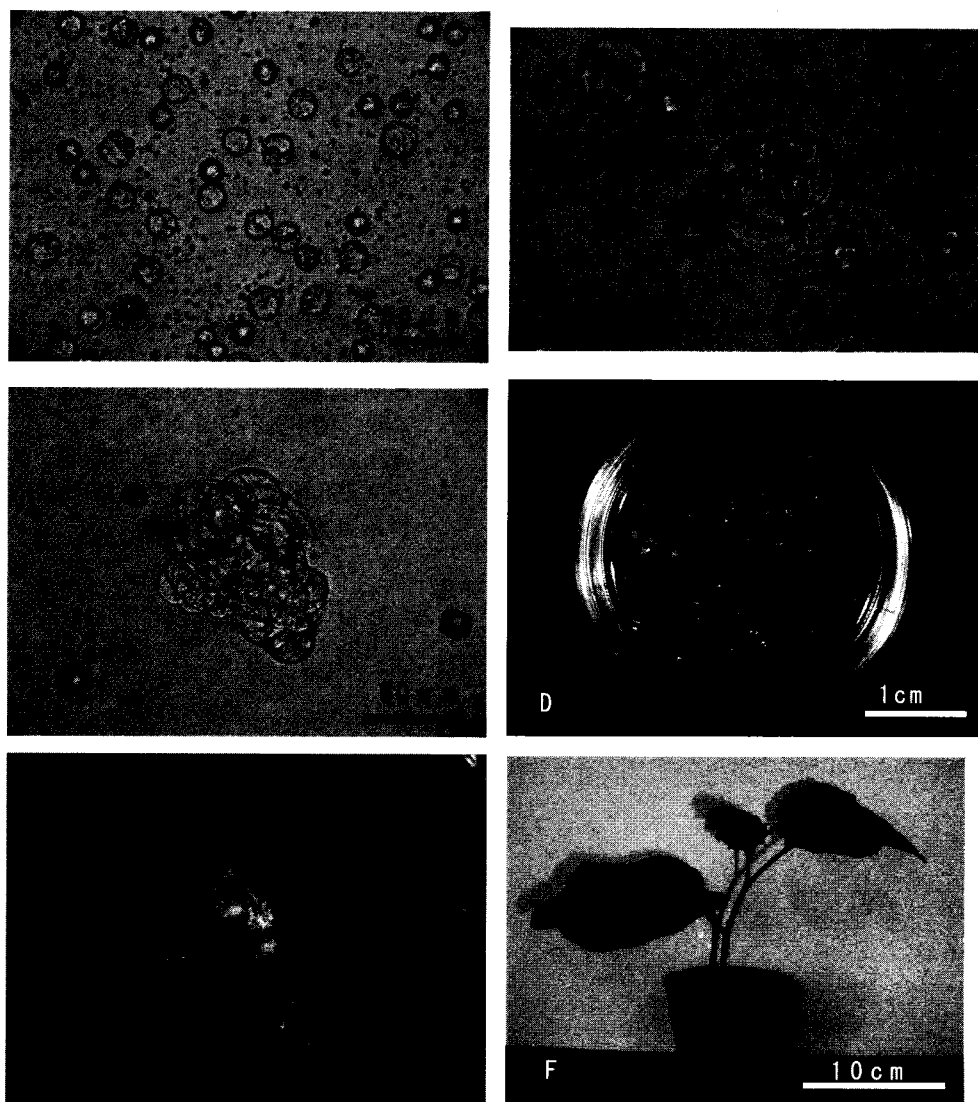
予備試験の結果、ヒラナスにおけるシュートの発根培地にショ糖 20 g/lとゲランガム 2 g/lを添加し、pH 5.8に調整した1/2MS培地を用いた場合、シュートは発根せずに黄化するものが多数であった。このため、本試験では1/2MS液体培地を含ませたフロリアライト培地について検討した結果、シュートの発根および生育が著しく改良された。さらに、フロリアライトで発根した植物体は、培地ごと鉢上げ用土へ定植することができた。このように、ヒラナスの植物体再生におけるフロリアライトの利用は、発根の誘導とin vitroから鉢上げまでの期間短縮に、極めて有効であった。

ヒロシマナ¹²⁾、ダイコン⁹⁾および栽培ナス⁸⁾の小孢子的培養では、半数体とともに自然倍加による二倍体や高次倍数体が得られたことが報告されている。本試験において、再生植物体の約50%は二倍体であり、半数体は約2%と少なく、その他は三倍体、四倍体および五倍体であった。本試験では薬壁等の体細胞組織はパーコールによる密度勾配分画によって取り除いていることから、ヒラナスにおける二倍体や高次倍数体は、小孢子がカルスを形成する過程で自然倍加したものと考えられる。今後は、カルスから植物体再生までの期間短縮など培養条件をさらに検討し、倍加半数体の頻度を高めることが課題である。

以上のように、ヒラナス(*S. integrifolium*)において小孢子から植物体を多数再生させる技術を確認した。また、再生植物のおよそ50%は二倍体であったことから、本技術はナス台木における青枯病抵抗性等の優良品種の早期育成に活用できるものと考えられる。

引用文献

- 1) 平島敬太・古賀正明・中原隆夫(1997) 青枯病菌菌体成分によるヒラナス(*Solanum integrifolium*)の細胞選抜. 福岡農総試研報16:53-58
- 2) Kao, K. N. and Michayluk, M. R. (1975) Nutritional requirements for growth of *Vicia*



第3図 ヒラナス小孢子からのカルス形成と植物体の再生

- A. 単離した小孢子 (前処理直後) D. 形成されたカルス (培養4週間目)
 B. 分裂を開始した小孢子 (培養7日目) E. カルスからのシュート再生 (培養8週間目)
 C. 分裂を繰り返した小孢子 (培養2週間目) F. 鉢上げした再生植物 (培養20週間目)

hajastana cells and protoplasts at very low population density in liquid media. *Planta* 126 : 105-110

- 3) 川合貴雄・伊達寛敬・飛川光治・坪井勇 (1993) ナス耐病性台木 'トレロ' の特性. *岡山農試研報* 11 : 27-3
- 4) Kott, L. S., L. Polisoni & W. D. Beversdorf (1988) Cytological aspects of isolated microspore culture of *Blossica napus*. *Can. J. Bot.*, 66 : 1658-1664
- 5) 松原幸子・徳毛謙治・村上賢治 (1993) ナスの栽培, 台木用品種の薬培養による時期別のカルスと胚様体形成. *園学雑*62別1 : 196-198
- 6) 松村政弘・大曾根兼一・田中繁男 (1989) 栽培ナス, 品種「黒陽」の薬培養での植物体再生と試験管内増殖. *育学雑*39別 : 64-65
- 7) 三柴啓一郎・三位正洋 (1998) FACSの細胞生物

学区への応用(3)植物研究への応用. *細胞工学*17(4) : 609-615

- 8) Miyoshi, K. (1996) Callus induction and plantlet formation through culture of isolated microspores of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Plant Cell Reports* 15 : 391-395
- 9) 三吉一光・川村美紀・板倉美樹・志賀敏夫 (1992) ダイコン (*Raphanus sativus* L.) 小孢子培養における植物体の再生. *育学雑*42別1 : 74-75
- 10) 門馬信二・赤澤茂樹・下坂欽也・坂田好輝・松永哲 (1997) 青枯病・半枯病複合抵抗性台木用ナス品種 '台太郎' の育成経過とその特性. *野菜茶試研報* 12 : 73-83
- 11) Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol plant* 15 : 473-479

- 12) 長久逸・井本征史 (1994) ヒロシマナの小孢子培養による植物体再生. 広島農技セ研報60: 47-54
- 13) 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
- 14) Ogawa, T., H. Fukuoka and Y. Ohkawa (1995) Plant Regeneration through Direct Culture of Isolated Pollen Grains in Rice. *Breeding Science* 45: 301-307
- 15) 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(1): 141-145
- 16) 岡田昌久・吉田建実・周松・矢野和孝・新田益男・松本満夫 (1998) 青枯病抵抗性ナス台木 '台太郎' の薬培養系統を使った台木育成 (第一報) '台太郎' の薬培養系統および薬培養系統とヒラナスの雑種の青枯病抵抗性. 園学雑67別2: 254
- 17) 岡村正愛 (2002) イオンビーム育種の実用化. 放射線と産業95: 57-63
- 18) 佐藤通浩・大窪恵美子・佐保学・板井隆・上曾山茂・植山昌人・福田賢二・信貴竜人・中尾茂夫 (2002) わい化栽培モモ台木ユスラウメの増殖法および苗木栽植後の管理法. 大分農技センター研報32: 33-49
- 19) 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. 野茶試研報A3: 55-65
- 20) 下坂欽也・赤坂茂樹 (1995) ナス薬培養による青枯病抵抗性台木系統の育成 (第2報) 青枯病抵抗性結果. 園学雑64別2: 246
- 21) 瀧川尚子・三輪龍士・武田恭明・矢澤進 (1992) ナスの薬培養における胚様体形成率の向上. 植物組織培養 9(3): 184-189