

シラネアオイ (*Glaucidium palmatum* Sieb. et. Zucc.) の葉片培養

鈴木 洋・菅井大輔・工藤幹生・小笠原宣好
山形大学農学部生物生産学科農業生産学講座
(平成11年10月1日受理)

Leaf Segment Culture of *Glaucidium palmatum* Sieb. et. Zucc.

Hiroshi SUZUKI, Daisuke SUGAI, Mikio KUDOH and Nobuyoshi OGASAWARA
Section of Agricultural Production, Department of Bioproduction,
Yamagata University, Tsuruoka 997-8555, Japan
(Received October 1, 1999)

Summary

Leaf segment culture was used for the propagation of "SHIRANEAOI (*Glaucidium palmatum*)" in this experiment. The results obtained are as follows: In the first year, optimum time of incubation (15th, 22th, and 30th of April) and optimum temperature of growth (15°C, 20°C, 25°C) for regeneration were determined with different concentrations of plant growth regulators NAA and BA. In the comparison of the incubation times, the incubation on 30th April was found disadvantageous for leaf growth and shoot regeneration. The concentration of NAA, 0.01mg/l seemed to be inadequate for growth and regeneration, but the concentration of NAA, 0.1mg/l was the best among the three different conditions tested. The concentration of BA, 1 mg/l seemed to promote shoot regeneration and the concentration of BA, 2mg/l was observed helpful for callus formation. In the second year the concentration of NAA, 0.1mg/l which was the best for the first year experiment did not show the same results. This might be due to the overage of the leaves. In contrast, the better growth and shoot regeneration were observed and true leaf development was found by the increase of NAA concentrations in the medium, although the shoots failed to produce roots ultimately.

Key words: *Glaucidium palmatum*, Leaf Segment culture, Shoot Regeneration

緒 言

シラネアオイ (*Glaucidium palmatum*) は、北海道から本州中部にかけて広がる温帯林や亜寒帯林のやや湿った林床に自生する多年生植物である。春には1茎当たり1輪の大きな4枚のがく片が花弁状をなす青紫色の美しい花を咲かせ、登山者や自然愛好家に人気の高い植物である。

佐野¹⁾によれば、シラネアオイは以前分類されていたキンポウゲ科から独立し、1科1属1種の貴重な日本特産種である。近年の土地開発により杉等の人工林が増加する一方、雑木林を含む落葉広葉樹林の減少に伴って、この植物は数を激減させ、環境の変化に弱く、自然への適応性も低いと思われるので、将来自然環境の変化によっ

て滅びる可能性が危惧される。

シラネアオイの現在の繁殖方法については、実生法は種子発芽の条件も明らかにされていないし、株分け法においても増殖効率は必ずしも高くない。そこで、シラネアオイにおいても組織培養による増殖を試みる必要があらう。

組織培養による観賞植物の繁殖法については、ラン科植物についてMorelら^{2) 3)}の成果をきっかけに単子葉植物を中心に茎頂培養によって多くの成果があげられてきた^{4) -7)}。これらの植物は茎頂からプロトコーム小体が多数出来る上に、多くの葉片が容易に得られ、材料の入手に恵まれているのに対して、シラネアオイは1茎に展開する葉の数がおよそ2枚と限られており、茎頂は勿論、葉片の採取も容易ではない。しかしながら、近年、双子葉植物についてもイワタバコ、バラ、アルストロメリア、キクなど、葉片を材料にした培養の成果が報告されてい

キーワード：シラネアオイ、葉片培養、不定芽形成

る^{8)~11)}。シラネアオイの葉は比較的大きく、葉の切片を培養するならば、本植物でも葉片培養が可能であると考えられる。本研究では2年間行った葉片培養の結果を報告する。

材料及び方法

1) 葉の採取期

材料は2カ年とも、4月中下旬、山形県鶴岡市荒倉山周辺の山地より葉を採取して用いた。供試した葉は1年目の実験では開花2週間前、展葉直後のもの（4月15日）、開花当日のもの（4月22日）、および開花が終わって花弁が落ちた後のもの（4月30日）と3期に分けて実験した。2年目の実験では葉の採取日は4月24日であったが、春先の気温が高く前年同期の採取葉よりもステージが進んでいた。従って前年の第3期相当と思われる程度の葉を供試した。いずれも病虫害のない濃緑色の上から2枚までの葉を使用した。

2) 葉の消毒

葉は中性洗剤で洗浄後、水道水で2回水洗し、クリーンベンチ内において、70%エタノールで約15秒間表面消毒を行い、滅菌水で洗浄後、1年目はTween20を数滴加えた有効塩素濃度1.7%のアンチホルミン液に入れ、攪拌しながら15分間消毒した。2年目は有効塩素濃度1.25%で10分間処理した。

3) 培地組成

基本培地は両年ともMS (Murashige & Scoog 1962) 培地とし、これに微量要素として葉酸を0.5mg/l 添加した改変MS培地とした。植物ホルモンと25g/lのショ糖を加え、pH5.8に調整し、寒天7g/lを加えた後、1年目は試験管(15mm×150mm)に10mlずつ分注し、オートクレーブで121℃、1.2kg/cm²、20分間殺菌したものをを用いた。なお、培地は平面培地とした。2年目は100mlのガラスのフラスコを用い、これに前年と同じ培地を50mlずつ分注し同条件でオートクレーブしたものを平面培地として供試した。

4) 培地の植物ホルモン濃度

1年目はNAAを0.01, 0.05, 0.1mg/l, BAを1.0, 2.0mg/lとして各々を組み合わせ、合計6区の試験区を設定した。2年目にはBA濃度については前年同様1.0, 2.0mg/lとしたが、NAAについては10倍の濃度0.1, 0.5, 1.0mg/lという設定とした。試験管1本当たり1個体とし合計植付け個数は270個体であった。

5) 葉片の植え付け条件

葉は殺菌後、クリーンベンチ内にて葉脈にそって5mm角に切り取り、1年目は外植体を縦にして培地に1/3程度埋め込んだ。この時、葉片の内部に太めの葉脈が必ず含まれるように準備しこの葉脈の下端が培地に潜るようにした。

2年目にはただ単に平面培地上に葉切片を平板状に置床した。

6) 培養の温度および光条件

1年目は光条件は、16時間日長3000Lux、培養温度は15℃、20℃、25℃の3区を設定し、2年目は培養温度は20℃区のみとし、16時間日長、3000Luxで90日間培養し、各区の生育及び器官分化の程度を比較調査した。

7) 継代培養

培養90日後、調査が終わった時点で、生き残り個体は再分化等を目的に、継代培地に移植した。継代培地の培地組成は基本培地については初期培地と同じMS培地としたが、植物ホルモンの2.4D1.0mg/lを加えた。

実験結果

1. 1年目(1995年)

本研究では、90日間の培養において葉片の肥大、不定芽及び不定根の形成、脱分化、色の変化等を中心に観察を行った。

1) 外植体の生育経過

植付け後の外植体は、葉片部の湾曲が目立った。また、10日後からは褐変するものが見られるようになった。しかし、培養15日後には多くの外植体で肥大反応が確認され、生育旺盛であった。

不定芽及びカルスの発生が観察されたのは培養40日前後で、それらは外植体の切断面や培地との接接地部に発生した。また20℃区に多く見られた(写真1, 2, 3)。培養90日後になると、無反応個体は緑色を失い枯死状態を呈した。また、僅かに反応のあった外植体も殆どが外観上枯死状態を呈した。また継代培養30日後に見かけの上で健全な状態で生存していた外植体数は僅かに11個体だけであった。しかし、それらも不定芽の生長が少々認められたものの徐々に褐変し、継代途中で全ての外植体が褐変してしまった。ところが、枯死したと思われていたその外植体からカルスが出現し、11個体中5個体からカルスが確認され、これらのカルスは増殖を続けた。

2) NAA・BA濃度と器官分化

第1表には1年目実験の結果を示した。また第1図には第1表の内NAAとBAについて濃度別に集計した結果

第1表 植付け90日後、シラネアオイ葉片の肥大率、不定芽形成率、脱分化率

(植付け日別・温度別合計)

植付日	培養温度℃	植物ホルモンの組合せ・濃度		供試数	葉 片 肥 大				不 定 芽 形 成				脱 分 化			
		NAA (mg/l)	BA (mg/l)		肥 大 個 体 数	肥大率 (%)	温度別合計肥大率 (%)	植付日別合計肥大率 (%)	形 成 個 体 数	形成率 (%)	温度別合計形成率 (%)	植付日別合計形成率 (%)	脱分化個体数	脱分化率 (%)	温度別合計脱分化率 (%)	植付日別合計脱分化率 (%)
4/15	20	0.01	1.0	10	4	40.0	66.7	66.7	0	0	(28.3)	28.3	2	20.0	58.3	58.3
		0.05		10	8	80.0			3	30.0			7	70.0		
		0.1		10	9	90.0			6	60.0			9	90.0		
		0.01	2.0	10	5	50.0			2	20.0			3	30.0		
		0.05		10	6	60.0			0	0			5	50.0		
		0.1		10	8	80.0			6	60.0			9	90.0		
4/22	15	0.01	1.0	5	2	40.0	33.3	31.1	1	20.0	(30.0)	24.4	1	20.0	10.0	16.7
		0.05		5	2	40.0			2	40.0			1	20.0		
		0.1		5	1	20.0			4	80.0			1	20.0		
		0.01	2.0	5	0	0			0	0			0	0		
		0.05		5	1	20.0			0	0			0	0		
		0.1		5	4	80.0			2	40.0			0	0		
	20	0.01	1.0	5	0	0	33.3		1	20.0	(20.0)		0	0	23.3	
		0.05		5	2	40.0			2	40.0			2	40.0		
		0.1		5	3	60.0			1	20.0			1	20.0		
		0.01	2.0	5	2	40.0			0	0			0	0		
		0.05		5	1	20.0			1	20.0			0	0		
		0.1		5	2	40.0			1	20.0			4	80.0		
	25	0.01	1.0	5	0	0	26.7		0	0	(23.3)		0	0	16.7	
		0.05		5	2	40.0			2	40.0			1	20.0		
		0.1		5	3	60.0			4	80.0			1	20.0		
		0.01	2.0	5	0	0			0	0			0	0		
		0.05		5	0	0			0	0			0	0		
		0.1		5	3	60.0			1	20.0			3	60.0		
4/30	15	0.01	1.0	7	0	0	37.5	20.0	0	0	(10.0)	5.8	0	0	0	
		0.05		7	2	28.6			0	0			0	0		
		0.1		6	2	33.3			2	33.3			0	0		
		0.01	2.0	6	0	0			0	0			0	0		
		0.05		7	5	71.4			1	14.3			0	0		
		0.1		7	6	85.7			1	14.3			0	0		
	20	0.01	1.0	7	0	0	20.0		0	0	(7.5)		0	0	0	
		0.05		6	1	16.7			0	0			0	0		
		0.1		7	0	0			1	14.3			0	0		
		0.01	2.0	7	1	14.3			0	0			0	0		
		0.05		7	4	57.1			2	28.6			0	0		
		0.1		6	2	33.3			0	0			0	0		
	25	0.01	1.0	6	0	0	2.5		0	0	(0)		0	0	0	
		0.05		7	0	0			0	0			0	0		
		0.1		7	0	0			0	0			0	0		
		0.01	2.0	7	0	0			0	0			0	0		
		0.05		6	1	16.7			0	0			0	0		
		0.1		7	0	0			0	0			0	0		

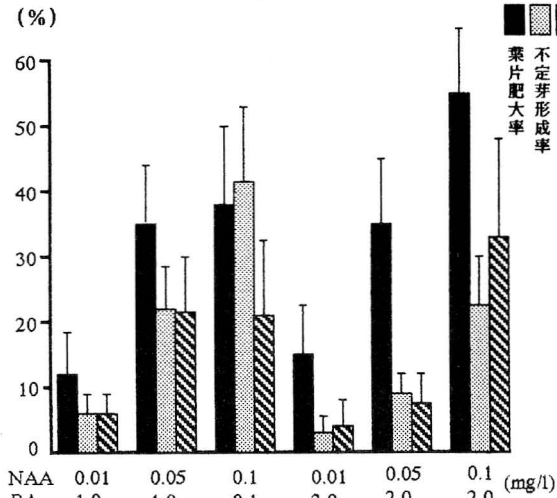
を示した。これらによれば、葉片肥大率、不定芽形成率および脱分化率ともNAA0.1mg/lとBA1.0ないし2.0mg/l添加区において最も反応の割合が高く、葉片肥大率では最高90%を示した区(4/15植え付け)もあり、合計の肥大率では53%を示した。また、NAA0.01mg/l添加区ではBA濃度に関係なく各反応の割合が10%前後と低くなっており、低濃度のNAAでは再分化が誘導されにくいことが認められた。

不定芽形成率と脱分化率についてはBA濃度の影響を受けている可能性があり、1mg/l添加区では不定芽形成

率が、2mg/l添加区では脱分化率がそれぞれ他と比べて良好であった。外植体の脱分化率(第1表)においては、4月15日に植え付けた外植体が全体で58.3%と高く、とりわけNAAが0.1mg/lの場合90%という高率の脱分化を示した。他区の組み合わせについても4月22日のようにNAAは0.1mg/lの時脱分化傾向が高かった。

3) 植え付け時期と分化

植付け日別にみた葉片肥大率、不定芽形成率および脱分化率の割合は第1表の通り、4月15日に植え付けた外植体において、すべての反応率が高かった。また、4月



第1図 葉片培養90日後における植物ホルモンの種類と濃度別の各反応の割合

※Tは標準誤差を表す

30日に植え付けた外植体の脱分化は1個体も観察されず、不定芽形成率も僅かに5.8%であった。このように同じ4月期の葉であっても、開花前と開花時、開花終了時では葉の持つ器官分化能にかなりの差が認められた。

4) 培養温度と分化

培養温度別の葉片肥大率、不定芽形成率および脱分化率の割合は、第2表の通りである。25℃区は各反応の割合が低く、生育、器官分化にとって高すぎる事が判明した。安定した反応を得たのは20℃区であった。ただし、不定芽形成に関しては15℃区、20℃区とも同じ20%で差異が認められなかった。データは示していないが、反応までの日数は、温度が高いほど短く、15℃区ではかなり

第2表 植付け90日後における培養温度別葉片肥大率、不定芽形成率、脱分化率

培養温度℃	供試葉片数	肥大葉片数(%)	不定芽形成個体数(%)	脱分化個体数(%)
15℃	70	25 (35.7)	14 (20.0)	3 (4.2)
20℃	130	57 (43.8)	26 (20.0)	41 (31.5)
25℃	70	8 (11.4)	7 (10.0)	5 (7.1)
合計	270	90 (33.3)	47 (17.4)	49 (18.1)

(NAA 0.01, 0.05, 0.1mg/l, BA 1.0, 2.0mg/l 添加培地各組合せ合計)

遅れて反応したが、分化したものは途中で座死するものが少なく確実に生長した。25℃区では、反応は早くても異常反応が多く、結局枯死してしまった外植体が多かった。データは示していないが、生育速度も培養温度が高いほど早かったが、安定して生育が良かった区は20℃区であった。

2. 2年目(1996年)

培養開始27日後から葉片の肥大が認められ、NAAとBAの各濃度組み合わせに対応する葉片の肥大と不定芽形成率の60日後のデータは第3表に示した通りである。

全植付け葉片数48に対して最低14.6% (NAA 0.1mg/l + BA 2.0mg/l), 最高62.5% (NAA 1.0mg/l + BA 2.0mg/l) の葉片肥大率を示した。概してNAAの濃度が高くなると肥大葉片の割合も高くなった。

また、培養42日後から、植え付けた葉片の培地に接している切断面から小さな不定芽が形成し始めた。培養60日後の不定芽形成率はNAA 0.5mg/l 以下の低濃度区では極めて成績悪く0%の区が多かった。しかし、NAA濃度の高い1.0mg/l 区では50%近くが不定芽を形成した。

不定芽形成が認められなかった区の葉片は培養60日後には葉片の全てが枯死した。しかし、さらに1ヶ月後の90日後には第4表に示したように不定芽形成が得られた。NAA 1.0mg/l + BA 1.0mg/l 区で77.1%, NAA 1.0mg/l

第3表 2年目実験：葉片培養60日後の葉片肥大と不定芽形成

NAA (mg/l)	BA (mg/l)	肥大葉片数/供試数	葉片肥大率 (%)	不定芽形成葉片数/供試数	不定芽形成率 (%)
0.1	1.0	11/48	22.9	1/48	2.0
0.1	2.0	7/48	14.6	0/48	0.0
1.5	1.0	21/48	43.8	0/48	0.0
0.5	2.0	19/48	39.6	0/48	0.0
1.0	1.0	23/48	47.9	21/48	43.8
1.0	2.0	30/48	62.5	28/48	58.3

(MS培地, ショ糖25g/l, 寒天7g/l 添加 pH: 5.8, 3000Lux, 16時間日長)

第4表 2年目実験：葉片培養90日後における不定芽の形成

NAA (mg/l)	BA (mg/l)	不定芽を形成 した葉片数 /供試数	不定芽形成率(%)
0.1	1.0	1/48	2.0
0.1	2.0	0/48	0.0
1.5	1.0	0/48	0.0
0.5	2.0	1/48	2.0
1.0	1.0	37/48	77.1
1.0	2.0	47/48	97.9

(MS培地, ショ糖25g/l, 寒天7g/l添加 pH: 5.8, 3000Lux, 16時間日長)

+BA 2.0mg/l 区で97.9%の高い不定芽形成率となった。発生した2～3cmの不定芽の形態には培地中に潜り込むように伸長して行くもの(写真4), 極性に従って上に伸長して行くもの(写真5)との2種類が認められた。しかし、これらの不定芽は継代培養の時期(最も早いもので不定芽形成から42日後)が遅かったためか成長が止まり、ついには枯死した。

考 察

シラネアオイについては材料植物自体特殊な、あまり人目につかない林床空間に適応した植物であるためか、組織培養についての報告は皆無の状況にある。

植え付け時期別に見ると、4月15日、4月22日、4月30日の順で分化の反応・生長は低下していった。従って、植え付け時期とシラネアオイの葉の器官分化能力との間には大きな関係があるといえる。この年の例でみると、4月22日に採取したシラネアオイは開花当日のものであり、これより以前の若いステージでの植え付けが望ましいと思われる。

西・釘貫ら¹²⁾は野菜の供試植物について供試部位は古い組織を用いるより若い組織の方が培養が容易であることが多く、これは若い組織では細胞の活性が高く、細胞分裂や再分化能が高いため、再分化能の高いカルスを得るためにも、活性の高い外植片を用いることが重要であると述べている。

2年目の実験ではこの年は暖冬のため春、暖くなるのが早く、採取、植付けを行なった4月24日にはシラネアオイはすでに開花の盛期を過ぎ、花が萎れる寸前という状況であった。これはおよそ前年の4月30日頃のステージに相当すると推察された。

これら、古い葉を用いた実験において最も良好な成績

を示した区はNAA濃度の高い1.0mg/l 区ではBA濃度の高低とはあまり関係なく、50%近い高率で不定芽を形成した。

採取植え付け時期や温度条件に対する反応を植物ホルモン処理の結果との関わりで考察すれば以下のように推察される。

前年度の葉片培養に適用した植物ホルモンの濃度は、NAA 0.01, 0.05, 0.1mg/l, BA 1.0, 2.0mg/l であった。そしてこの中で最も不定芽形成率が高かった組合せはNAA 0.1mg/l + BA 2.0mg/l 区であった。

原田ら¹³⁾によれば多くの場合培地中のオーキシンの対するサイトカイニンの比率が高いほど不定芽の分化が促進され逆にオーキシンの比率が高い時には不定根分化が促進されるとしている。この見解には一致しないことにはなるが、前年のNAA最適濃度が上限値0.1mg/l であったことを踏まえて、これよりさらに高い濃度域のNAAを検討する意味から前年の10倍の濃度、0.1, 0.5, 1.0各mg/l とし、BAについては前年通り1.0, 2.0mg/l に設定し、植物体の変化を調査し、シラネアオイの葉片培養における最適植物ホルモン濃度を決定づけようと試みた。しかし、実際反応があったその殆どは3区中最も高濃度のNAA 1.0mg/l 区であり、前年度60%もの不定芽形成率(4月15日採取、植付け)を得たNAA 0.1mg/l 区では、翌年、葉片の肥大反応は確認できたものの不定芽の形成は殆ど確認されなかった。前年の場合NAA 0.1mg/l とオーキシンの濃度が低くても未だ葉の老化はあまり進んでいないので、何とか器官分化能を維持していたのに対して、翌年の実験では4月24日にはシラネアオイは完全に開花しており、0.1mg/l という低濃度のオーキシン添加では器官分化に不十分であったのに対して、高濃度のオーキシン添加区では器官分化が可能になったものと考えられる。いずれにしても、適期を過ぎた葉片の培養であっても植物ホルモンを高濃度に設定する単純な操作によって器官分化能を維持出来る可能性が得られた。

今後葉片培養によってシラネアオイの大量増殖を行う場合参考になると考えられる。

両年度間では必ずしも全て同一条件下での比較がなされたわけではないが、全体的に見て2年目の方が成績良好であった。

1年目の実験について、培養適温に関しては25, 20, 15℃の順で反応は早かったが、25℃区は当初反応のあったものでさえも培養90日以降は枯死したものが多かった。逆に15℃区は反応は遅いものの確実に生長し枯死個体が

少なかった。戸外の自然条件下でシラネアオイが生育する状況を考えると、4月上旬、気温がおおよそ15℃位になると落ち葉の下等で発芽した越冬芽は急速に肥大して、地表に頭をもたげ20℃位の条件下で若葉を急速に展開し4月中下旬に花を咲かせる。その後初夏の頃に至り、25℃位の高温期になると葉の生長は止まり、専ら果実や種子の充実をはかるようになる。15℃～20℃の頃は本植物にとって最も旺盛な生育を続ける時期に相当し、*in vitro* 培養にあたっては本植物の生長のリズムを考えるならば、この程度の温度条件は生育にとって最も好ましいことが推察される。Tran¹⁴⁾ はペゴニア葉柄からの不定根、不定芽の分化が温度条件により影響され、その場合温度効果と植物ホルモンの効果とが互いに関係しあっていると述べている。

ニンジンでも培養温度による不定胚分化への影響について報告¹³⁾ がなされ、低温・高温で阻害されるが、35℃程度の高温では根の伸長はあまり阻害されずシュートの分化がかなり阻害されることが指摘されている。シラネアオイにあっても培養温度が変わることで様々な生理過程が影響を受けることが考えられるが、葉片培養の不定芽形成に対する温度条件の反応を調査するに当たってもその時の培地の植物ホルモン濃度条件等との関連で今後調査を進めて行く必要もあるだろう。

かなり多くの分化した不定芽が得られたにも関わらず再生個体が得られなかったことについては、継代培地における植物ホルモン選択の失敗が考えられた。継代時にオーキシンに2,4-Dを用いて発根及びカルスの増殖を狙ったが、発根すら観察されず見かけ上全て枯死し、カルスだけが形成された。これは、2,4-Dが専ら脱分化のためのみに働き、器官分化や個体の生育には阻害的に働いたためと考えられる。一般的に継代培地は、同じホルモン濃度かあるいは低濃度で組成され、発根は低濃度のサイトカイニンによって促進される。これらを考慮して今後ホルモンの種類と濃度の検討を進めたい。

また、脱分化、不定根の形成については確認されなかったため、それらを促す培地組成の検討が必要である。この点に関して、添加ビタミン類の作用性や基本培地の種類と濃度の検討なども望まれる。

要 約

シラネアオイの効率的増殖法の一つとして葉片培養を試みた。2カ年にわたる実験の結果次ぎのようなことが明らかにされた。

1) 1年目、植物ホルモンNAA, BAの施用処理と平行して、植え付け時期（4月15日, 22日, 30日）、培養温度（15℃, 20℃, 25℃）が葉片の生育と不定芽などの再生に及ぼす効果を比較した。前者に関しては4月30日の植え付けは生育や再生にとって好ましくないこと、また培養温度条件は生育の早さも考えると20℃が適していると推察された。

2) NAAは0.01, 0.05, 0.1mg/lの3区の内0.01mg/lは低すぎて適さず、0.1mg/l区が最も高い成績を示した。BAは1mg/lでは不定芽の形成を、2mg/lではカルスの分化を促す傾向が認められた。

3) 2年目の実験では、前年度最良のNAA 0.1mg/l区は成績が悪く、葉齢の進み過ぎが原因と考えられた。しかし、NAAの濃度を高めたことで、前年を上回る好結果が得られ、本葉の展開に至った不定芽が見られた。これらの不定芽は発根と個体の再生には至らなかった。

引 用 文 献

- 1) 佐野 泰・田村道夫 (1988): The Grand Dictionary of Horticulture No. 2 小学館 東京: 572-573.
- 2) Morel, G. (1960): Producing virus-free *cymbidiums*. Amer. Orchid Soc. Bull. 29: 495-497.
- 3) Morel, G. (1960): Tissue culture-a new means of clonal propagation in orchids. Amer. Orchid Soc. Bull. 33: 473-478.
- 4) Winber, D. E. (1963): Clonal multiplication of *cymbidiums* through tissue culture of the shoot meristem. Amer. Orchid Soc. Bull. 32: 105-107.
- 5) Fujino, T. (1972): Multiplication of Dutch Iris (*Iris hollandica*) by organ culture. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 41: 72-75.
- 6) 樋浦 巖・鈴木 洋・今西 茂・後藤由紀子・鏡 恵・武藤安己余・山口千草 (1993): 葉片培養によるキシノウブ (*Iris pseudacorus*) の植物体再生とハナショウブ (*I. ensata*) のシュート再生. 山形農林学会報 50: 55-61.
- 7) 樋浦 巖・篠原 亘・鈴木 洋・今西 茂 (1995): 野生ヒメサユリ (*Lilium rubellum*) の葉片培養におけるサイアミンの影響. 山形大学紀要 (農学) 12: 141-153.
- 8) 樋浦 巖・山崎英優・鈴木 洋・今西 茂 (1993):

- イワタバコ (*Conandron ramondioides*) の葉片培養. 山形大学紀要 (農学) 11 : 717-725.
- 9) Visessuwan, R. Kawai T. and Mii, M. (1997) : Plant regeneration systems from leaf segment culture through embryogenic callus formation of *Rosa hybrida* and *R. canina*. *Breeding. Science. Sep.* 47 (3) : 217-222.
- 10) Lin H. S., Dejeu. M. j. (1998) : Formation of shoots from leaf axils of *Alstromeria*. The effect of the position on the stem. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 52 (3) : 165-169.
- 11) Aribaut M., Kevers C., Martin T. and Gaspar T. (1998) : Low activity of amine- oxidases and accumulation of conjugated polyamines in disfavour of organogenic programs in *chrysanthemum*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 52 (3) : 165-169.
- 12) 西 貞夫ら (1990) : 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. 34頁. 農業図書. 東京.
- 13) 原田 宏・駒嶺 穆 (1993) : 植物細胞組織培養. 79-99. 理工学社 東京
- 14) Tran Thanh Van, K. (1977) : *Plant Tissue Culture and its Bio-Technological Application.* 367-385.

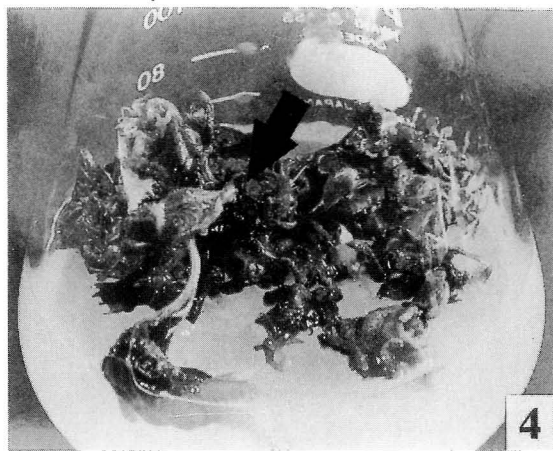
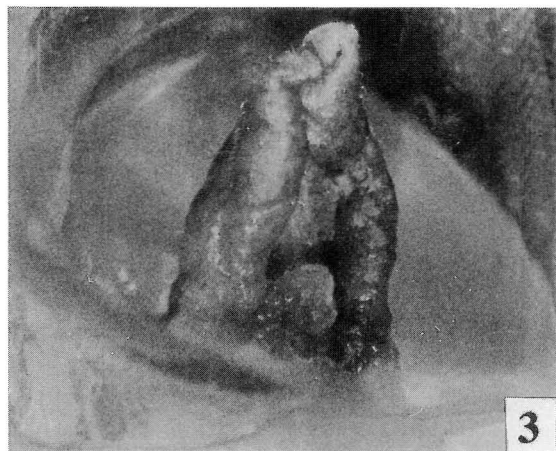
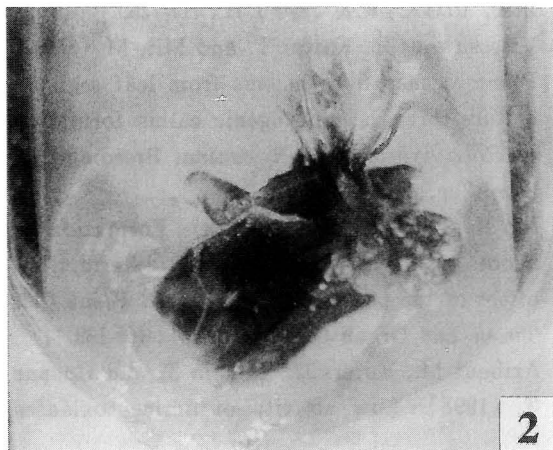
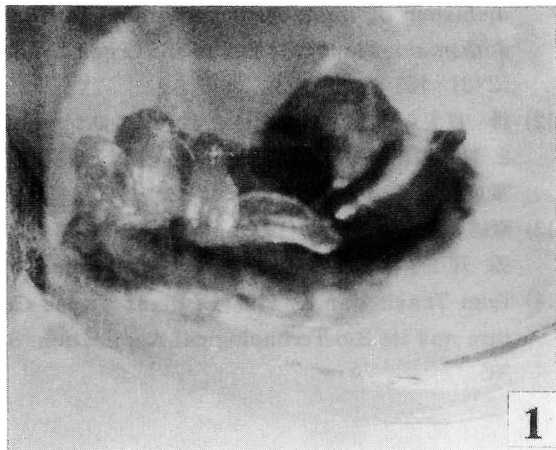


写真1：培養50日後，発生したばかりの不定芽
(NAA 0.1, BA 1.0mg/1添加区・4月30日植え付け・20℃)

写真2：培養60日後の不定芽。

突起状の不定芽が葉状体になりつつある。

(NAA 0.05, BA 1.0mg/1添加区・4月22日植え付け・20℃)

写真3：培養70日後，基部中央にカルス塊発達。

(NAA 0.1, BA 2.0mg/1添加区・4月15日植え付け・20℃)

写真4：培養90日後の葉片から発生した不定芽。

(NAA 1.0, BA 2.0mg/1添加区) 中央↓印褐変した部分が
外植体。発生した匍匐傾向のある不定芽により培地から浮く。

写真5：培養90日後の葉片から発生した不定芽。

(NAA 1.0, BA 2.0mg/1添加区)

細長い軸を伴った立性の不定芽が認められる。

シラネアオイの葉片培養によって生じた不定芽またはカルスの写真