

ホウレンソウの低シュウ酸含量品種育成に関する研究 (Ⅷ) —組織培養で得た低シュウ酸ホウレンソウの後代—

太田和子

岐阜女子大学 家政学部 健康栄養学科

(2016年11月18日受理)

Studies on the Breeding of Some Varieties of Spinach (*Spinacia oleracea* L.) with Low Level Oxalic Acid. (Ⅷ) —The Progenies of Low Oxalic Acid Spinach Plants Produced by Tissue Culture—

Department of Health and Nutrition, Faculty of Home Economics,
Gifu Women's University, 80 Taromaru, Gifu, Japan (〒501-2592)

OTA Kazuko

(Received November 18, 2016)

要 旨

ホウレンソウ (*Spinacia oleracea* L.) の低シュウ酸含量品種の育成を目的に、組織培養で得られた低シュウ酸雌株あるいは高シュウ酸雌株を低シュウ酸雄株と交配し、その後代のシュウ酸含量を調べた。子世代では低シュウ酸雌親株からも高シュウ酸雌親株からも低シュウ酸の子株が多数得られた。しかし、孫世代や第4世代では、中程度のシュウ酸含量個体が多くなり、低シュウ酸遺伝子を持っていると思われる系統は得られなかった。

緒言

ホウレンソウの味や健康に好ましくない成分であるシュウ酸の含量を低くすることを目的に、香川¹⁾²⁾はシュウ酸含量と系統、品種、生態条件の関係について検討し、シュウ酸含量を低下させる栽培条件について明らかにした。さらに筆者らは低シュウ酸含量品種育成の研究を1989年より進めてきた^{3)~7)}。

前報⁷⁾では、無菌発芽苗の根培養から植物体順化までのホウレンソウの組織培養系の確

立について報告した。そして、カルスや不定胚に紫外線を照射した株の順化後のシュウ酸含量を測定したところ低シュウ酸のホウレンソウが得られたことを報告した。

ホウレンソウは、1年生草本で低シュウ酸の個体が得られても、翌年は枯れてしまう。また、雌雄異株植物である。そこで、得られた低シュウ酸の個体を雌雄で交配し、その後代についてシュウ酸含量を調べ、低シュウ酸系統の育成を図ったので、その経過を報告する。

材料および方法

1. 供試材料

前報⁷⁾で報告した2008～9年度にミンスターランド丸種品種と晩抽パルク品種より順化に成功した個体の中から雌株17個体、雄株9個体を親株として2009年に交配に用いた。交配に用いた個体を表1に示す。花粉親として用いた雄株は、比較的シュウ酸含量の低いものを用い、雌株は様々なシュウ酸含量の株を用いた。

表1 交配に用いた親株

雌雄	個体番号	シュウ酸含量 (mg/100 gFW)
雌株	MLCont. 7	939.31
	MLCont. 13	1769.34
	MLCont. 15	未測定
	ML 1 h ②	未測定
	ML 1 h ③	未測定
	ML 1 h ④	未測定
	ML 1.5 h ③	827.7
	ML 1.5 h ④	1043.15
	ML 1.5 h ⑤	1494.94
	ML 2 h ①	599.37
	ML 2 h ③	737.44
	ML 2 h ⑤	1405.4
	ML 2 h ⑥	1510.74
	ML 2 h ⑦	2149.65
	ML 2 h ⑧	未測定
	P 1 h ①	747.9
	P 1 h ②	909.87
	雄株	MLCont. 1
MLCont. 2		507.71
MLCont. 3		642.55
MLCont. 4		731.53
MLCont. 5		801.87
MLCont. 6		929.1
ML 1.5 h ②		660.31
ML 2 h ②		638.97
ML 2 h ④	890.23	

MLはミンスターランド丸種品種より育成した株、Pは晩抽パルク品種より育成した株。時間は紫外線照射時間。Cont.は紫外線を照射していないもの。

2. 交配・採種

2009年は雄花の方が雌花より早く咲いたので、表1に示す雄株の花粉を採取、混合して小ビンに入れ冷蔵庫で保存した。開花前の雌花には袋をかけ、開花後に脱脂綿を用いて花粉を付けた。

2010年の子世代株の交配、2011年の孫世代株の交配、2012年の4世代株の交配では、同時期に開花した雄株と雌株を選び個々に交配した。雌花には他の花粉が付かないように袋かけを行った。開花時期の都合で雌株あるいは雄株に2個体を使用した場合もあった。

交配は5月～6月に行った。

交配後、種子を付け、茎葉が枯死した雌株を鉢から抜きバットで自然乾燥させた。乾燥した株から種子を取り、小瓶に入れ、デシケーター内で保管した。

3. 栽培の概要

黒ビニールポット(直径7cm)に園芸用の網を敷き、1cmほど赤玉土を入れ、その上にプライムミックスTKS-2((株)サカタ、N:270～370 mg/L, P:180～250 mg/L, K:340～460 mg/L, pH 5.0～6.0)を入れ、種子を一粒ずつ播種した。ほとんどの種子は10月に播種したが、2011年産の種子数の多い系統では、2012年の4月にも播種を行った。

播種した種子が芽を出し、3cmほどに成長したところで、直径15～25cmの駄温鉢または黒ビニールポットに移植した。用土は播種時と同じものを用いた。時々、ハイポネックス(N6-P10-K5)の1000倍希釈液を肥料として与えた。

栽培は無加温のビニールハウス内で行った。

4. シュウ酸の定量

HPLC(高速液体クロマトグラフィー)によりシュウ酸の定量を行った。

生育したハウレンソウの葉を数枚採取し、

水道水で洗った後に、キムペーパーで水気をふき取り分析試料とした。試料をはさみで細かく刻んだ後よく混ぜ合わせ、各試料0.1 gずつを秤量した。分析は3連または2連で行った。

この試料を平底試験管に入れ、2 N-HCl 1 mLを加えて、アルミ箔で蓋をし、ウォーターバスで30分間煮沸した。冷却後、蒸留水を少量加え、ろ紙 (No. 2) でろ過した。ろ液をメスフラスコで100 mLに定量し、そのうち約10 mLをメンブレンフィルター (0.45 μm) を付けたガラス注射器でろ過した。これを HPLC 用分析試料とした。

HPLC の分析条件としては、カラムは Shim-Pack SCR-102 H (内径8 mm×長さ30 cm, 島津製作所) を40°C で用いた。移動相は0.1% リン酸水溶液を流速1.0 mL/min で流した。分析時の圧力は約70 kg/cm²であった。検出器は、紫外線分光光度検出器 SPD-6 A (島津製作所) を用い、波長210 nm, ABS

倍率0.01に設定した。試料注入量は25 μL とし、標準のシュウ酸を測定しピークの高さを比例計算して、試料のシュウ酸濃度を求めた。

結果

1. 子世代

組織培養株を順化させた親株を交配した子世代の発芽およびシュウ酸測定の状態を表2にまとめた。16個体の雌親株より469個の種子が得られた。このうち、雌親株が低シュウ酸だった種子を優先的に播種して、約半分程度の272個の種子を播種した。そのうち発芽数は49個体で、発芽率18%であった。生育途中に生育不良となった個体もあり最終的にシュウ酸を測定できたのは47個体であった。

親世代と子世代のシュウ酸含量別の個体数の結果をまとめたものを図1に示した。シュウ酸を測定できた子株の雌親としては6個体

表2 子世代株の発芽とシュウ酸測定の状態

雌親株	採取種子数	播種数	発芽数	シュウ酸測定個体数
MLCont. 7	21	21	0	0
MLCont. 13	148	66	20	20
MLCont. 15	0	0	0	0
ML 1 h ②	10	10	0	0
ML 1 h ③	20	20	4	4
ML 1 h ④	5	0	0	0
ML 1.5 h ③	19	19	0	0
ML 1.5 h ④	3	0	0	0
ML 1.5 h ⑤	73	0	0	0
ML 2 h ①	26	26	2	2
ML 2 h ③	22	22	0	0
ML 2 h ⑤	29	0	0	0
ML 2 h ⑥	5	0	0	0
ML 2 h ⑦	20	20	1	1
ML 2 h ⑧	24	24	1	1
P 1 h ①	11	11	0	0
P 1 h ②	33	33	21	19
合計	469	272	49	47

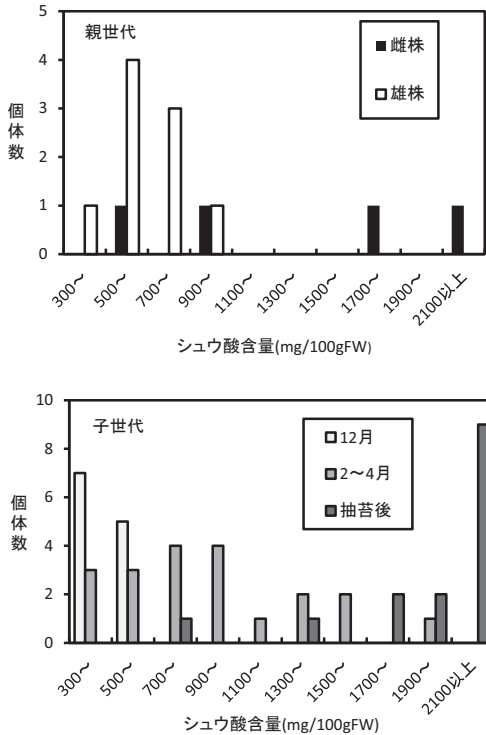


図1 親世代と子世代のシュウ酸含量
子世代は試料の採取時期により分けた。

を用いたが、2個体はシュウ酸含量を測定していない株だったので、図1には4個体のみを示した。雄株は低シュウ酸で、雌株は低シュウ酸の個体と高シュウ酸の個体であった。子世代でも低シュウ酸の個体と高シュウ酸の個体が多く、中間のものが少ない傾向が見られた。

しかし、試料採取時期の影響も見られ、12月に採種した若い葉を使用した測定では低シュウ酸、抽苔後の葉を使用した測定では高シュウ酸の傾向が見られた。対照区としてミンスターランド丸種品種を播種して同様に栽培しシュウ酸含量を測定したところ、1月に採取した試料では587 mg/100 gFW、5月に採取した試料では1867 mg/100 gFW と採取時期により大きな違いが見られた。

そこで、抽苔期に測定したものを除いて、

低シュウ酸雌株の子世代と高シュウ酸雌株の子世代を比較したところ、採取時期の影響は出ているが、低シュウ酸の雌親株でも高シュウ酸の子株が作出され、高シュウ酸雌株にも低シュウ酸の子株が作出された(図2)。しかし、高シュウ酸雌株の子株では、高シュウ酸のものは、シュウ酸含量がより高い傾向が見られた。

次に交配に用いた雌株と雄株を表3に示す。子世代では、コントロールのシュウ酸含量(587 mg/100 gFW)より低かった低シュウ酸雌株と低シュウ酸雄株の交配を行った。また比較のために高シュウ酸雌株と中程度のシュウ酸または高シュウ酸雄株の交配を行った。低シュウ酸雌株として用いた4個体は高シュウ酸雌株の子株であり、それに交配した低シュウ酸雄株も同じ雌親株の子株なので、

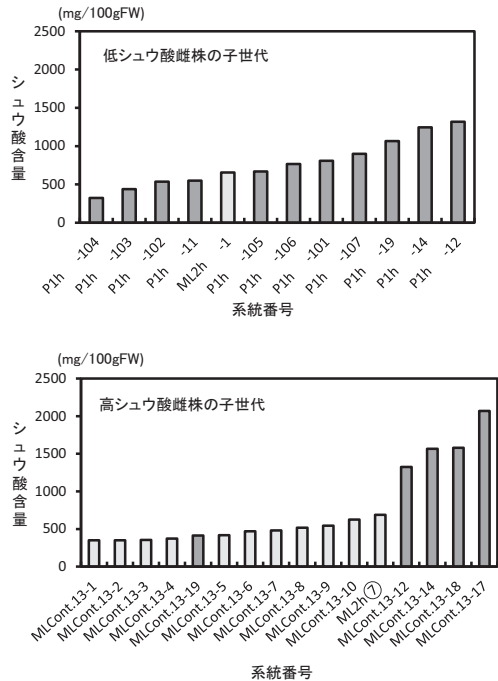


図2 低シュウ酸雌親株の子世代と高シュウ酸雌親株の子世代のシュウ酸含量

薄い灰色は12月に、濃い灰色は2~4月に試料を採取した。

表3 子世代株の交配

雌株		雄株	
個体番号	シュウ酸含量 (mg/100 gFW)	個体番号	シュウ酸含量 (mg/100 gFW)
MLCont. 13-1	349	MLCont. 13-3	355
MLCont. 13-6	470		
MLCont. 13-4	374	MLCont. 13-5	418
MLCont. 13-19	414		
MLCont. 13-20	3245	ML 1 h ③-3	861
P 1 h ②-15	2511	ML 2 h ①-2	1913

兄弟姉妹交配となった。一方高シュウ酸株の交配はばらばらの系統であった。

2. 孫世代

子世代株を交配してできた孫世代株の発芽状況とシュウ酸測定個体数を表4に示した。6個体の雌親株より133個の種子が得られた。前年に比べ採取種子数は少なかったため、全部を播種した。発芽数は60個体で、発芽率45%であった。高シュウ酸雌株と高シュウ酸雄株の交配した孫株は、種子数が少なく、発芽もしなかった。高シュウ酸雌株と中程度のシュウ酸雄株を交配した孫株も種子数が少なく、1個体しか生育しなかった。最終的にシュウ酸を測定した個体は54個体となった。

前年の結果を参考にして、シュウ酸含量が安定する3~5月に試料採取を行った。孫世代のシュウ酸含量を図3に示した。1100~1300 mg/100 gFWのシュウ酸含量の個体が

最も多く、700 mg/100 gFW以下の個体は見られなかった。

コントロールとしてミンスターランド丸種品種のシュウ酸含量を同時期に測定した値は、1168 mg/100 gFWであった。

低シュウ酸雌株と低シュウ酸雄株の交配では、親に用いた子世代株のシュウ酸含量(500 mg/100 gFW以下)に比べ、すべて高くなった。低シュウ酸雌株と中程度のシュウ酸雄株(861 mg/100 gFW)を交配した1個体だけの孫株は、2003 mg/100 gFWで高シュウ酸個体であった。

測定に用いた孫世代株54個体のうち、雌株が21個体、雄株が25個体、8個体は記帳漏れなどで不明であった。間性株は見られなかった。また、ミンスターランド丸種品種では、葉に切れ込みが深く入っているが、ミンスターランド丸種品種を組織培養し交配した

表4 孫世代株の発芽とシュウ酸測定状況

子世代雌株	採取種子数	播種数	発芽数	シュウ酸測定個体数
MLCont. 13-1	49	49	24	22
MLCont. 13-6	54	54	21	20
MLCont. 13-4	13	13	1	1
MLCont. 13-19	14	14	13	10
MLCont. 13-20	2	2	1	1
P 1 h ②-15	1	1	0	0
合計	133	133	60	54

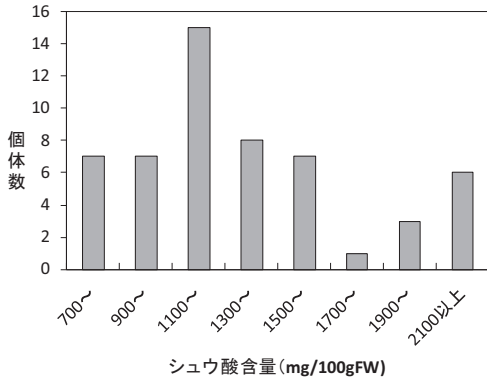


図3 孫世代のシユウ酸含量

孫世代は、深く切れ込みが入った個体：浅い切れ込みの個体が約2：1で分離した。また、花茎に奇形が見られたものが15株あった。

孫世代で交配に用いた雌株と雄株を表5に示した。孫世代では、700 mg/100 gFW以下の低シユウ酸個体は見られなかったので、コ

ントロール (1168 mg/100 gFW) に比べてシユウ酸の少ない個体を親として交配に用いた。親として用いた個体は、すべてミンスターランド丸種品種から紫外線照射せずに育成した雌株 (MLCont. 13) の孫となった。

3. 第4世代

第4世代の発芽状況とシユウ酸測定個体数を表6に示した。5個体の雌親株より2144個の種子が得られた。すべての世代の中で最も多くの種子が得られた。そのため MLCont. 13-1-10の種子は秋には播種せずに一部を翌春に播種した。発芽数は945個体で発芽率71%であった。栽培個体数が多く、分析が追い付かず、シユウ酸分析ができた個体は188個体とこれまでの世代で最も多かったが、発芽した個体の約20%であった。

シユウ酸含量は最低の個体で218 mg/100 gFWで、700~900 mg/100 gFWの個体数が

表5 孫世代株の交配

雌株		雄株	
個体番号	シユウ酸含量 (mg/100 gFW)	個体番号	シユウ酸含量 (mg/100 gFW)
MLCont. 13-1-10	942	MLCont. 13-1-25	1015
		MLCont. 13-6-31	1024
MLCont. 13-6-5	1095	MLCont. 13-1-47	896
MLCont. 13-6-11	1010		
MLCont. 13-1-43	1071	MLCont. 13-6-15	951
MLCont. 13-6-54	1026	MLCont. 13-6-18	940

表6 第4世代株の発芽とシユウ酸測定状況

孫世代雌株	採取種子数	播種数	発芽数	シユウ酸測定個体数
MLCont. 13-1-10	860	50	19	19
MLCont. 13-6-5	315	315	203	10
MLCont. 13-6-11	375	375	275	45
MLCont. 13-1-43	140	140	62	0
MLCont. 13-6-54	454	454	386	114
合計	2144	1334	945	188

表7 第4世代株の交配

雌株		雄株	
個体番号	シュウ酸含量 (mg/100 gFW)	個体番号	シュウ酸含量 (mg/100 gFW)
MLCont. 13-1-10-5	885	MLCont. 13-1-10-2	397
MLCont. 13-6-54-3012	831		
MLCont. 13-1-10-12	635	MLCont. 13-1-10-10	450
MLCont. 13-1-10-19	218		
MLCont. 13-6-11-33	746	MLCont. 13-6-5-1	583
MLCont. 13-6-11-1012	535	MLCont. 13-6-11-1007	651
MLCont. 13-6-11-1013	729	MLCont. 13-6-5-52	230
		MLCont. 13-6-11-1018	870
MLCont. 13-6-54-2068	914	MLCont. 13-6-54-3024	573

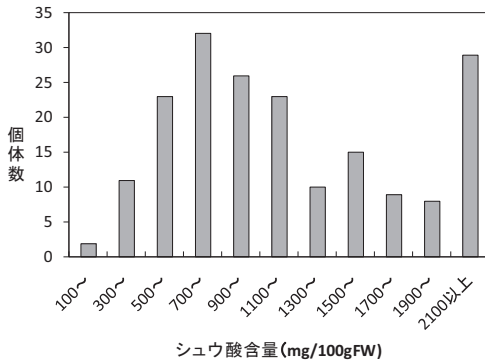


図4 第4世代株のシュウ酸含量

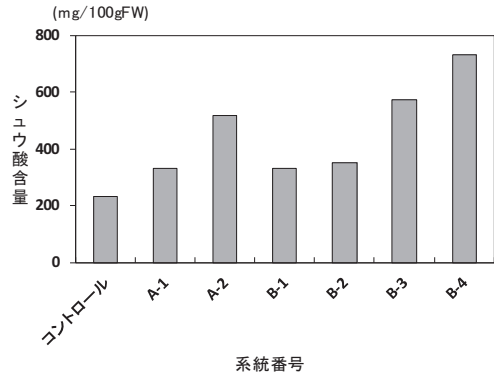


図5 第5世代のシュウ酸含量

系統番号のAはMLCont.13-6-11-1013の子株, BはMLCont.13-6-54-2068の子株を示す。

最も多く、そこをピークにその前後の個体数が多かった(図4)。また、2100 mg/100 gFW以上の個体も多かった。

この世代で交配を行った個体を表7に示す。シュウ酸含量が1000 mg/100 gFW未滿の低含量の個体を用いた。雌株8個体, 雄株7個体を用いた。

4. 第5世代

第5世代の発芽状況とシュウ酸測定状況を表8に示した。8個体の雌親株のうち種子が取れなかった雌株が半分もあり、4個体の雌株から124個の種子が得られた。種子数はすべての世代の中で最も少なかった。発芽率も

5%と最も低く、最終的に6個体しか発芽, 成長しなかった。

第5世代のシュウ酸含量は、2月に試料を採取したので全体的に低い値であった(図5)。コントロールは、ミンスターランド丸種品種の値であるが、生育が不良となり、シュウ酸含量が233 mg/100 gFWと低い値となった。MLCont. 13-6-11-1013の子株で1個体, MLCont. 13-6-54-2068の子株で2個体が500 mg/100 gFW未滿であった。

表8 第5世代株の発芽とシュウ酸測定状況

第4世代雌株	採取種子数	播種数	発芽数	シュウ酸測定個体数
MLCont. 13-1-10-5	0	0	0	0
MLCont. 13-6-54-3012	3	3	0	0
MLCont. 13-1-10-12	0	0	0	0
MLCont. 13-1-10-19	0	0	0	0
MLCont. 13-6-11-33	0	0	0	0
MLCont. 13-6-11-1012	30	30	0	0
MLCont. 13-6-11-1013	74	74	2	2
MLCont. 13-6-54-2068	17	17	4	4
合計	124	124	6	6

考察

1. シュウ酸含量の変動要因

シュウ酸含量の測定には、数枚の葉を細かく切って混合し、その中から0.1gを量り取って、2~3連で分析に用いたが、葉の部位によってシュウ酸含量は異なり、また葉の位置によってもシュウ酸含量は異なると言われている⁸⁾ので、分析部位による影響も大きかったと考えられる。また、ハウレンソウの生育ステージによってもシュウ酸含量が異なる⁸⁾ので、試料採取時期によってさらに大きな影響を受けたと考えられる。子世代のシュウ酸含量の測定に際して、試料採取時期が長期にわたり、生育ステージの早いものは、シュウ酸含量が低く、遅くなるにつれてシュウ酸含量が高くなる傾向が見られた(図1)。特に抽台期に高い傾向が見られた。これまでは、収穫期より老化が進むとシュウ酸含量が減少するとの報告⁸⁾があったが、反対に高くなっていった。これは抽台した茎に付いた葉の一部を分析し、生重当たりのシュウ酸量で表しているの、葉が栄養成長期と比べ明らかに小さく薄く乾燥しているの、生重当たりになるとシュウ酸含量が高くなるのではないかと考えられる。

Hataら⁹⁾は、低シュウ酸ハウレンソウの選

抜のためにリーフディスクを用いた2段階選抜法で効率よくシュウ酸分析を行ったことを報告している。第4世代では、シュウ酸分析が生育に追いつかず、20%の個体しか分析できなかったの、より効率的な選抜方法を導入していかなければならない。

また、水分、温度、肥料成分などの生育条件によってもシュウ酸含量は大きな影響を受ける⁸⁾。多数の試験植物体を栽培したので、全部を同じ条件で育てるのは難しく、生育差が出てそれがシュウ酸含量に影響したと考えられる。コントロールとして播種したミンスターランド丸種品種のシュウ酸含量も試料採取時期やその年の生育状態によって、大きく変動していた。

2. 交配, 採種, 発芽, 生育について

シュウ酸の分析の遅れから交配が計画的に進められず、せっかく組織培養から育成した様々な系統を残せずに1つの系統の子孫になってしまった。特に子世代の交配で低シュウ酸親株より得られた低シュウ酸子株を交配せずに、高シュウ酸親株から得られた低シュウ酸子株を交配に使用してしまった(表3)のが、低シュウ酸系統を育成できなかった大きな原因ではないかと考える。

年によって、採種数、発芽率が大きく異なった(表2, 4, 6, 8)。子世代、孫世代では、花

茎が帯化した奇形や抽台しても花が咲かない個体等も見られ、花粉の稔性にも問題があったのかも知れない。最も採種数が多かった第4世代は、交配に用いた孫世代の雌株あたりの雌花数が多かったことが種子生産量の多かったことに影響していた。一方、種子数が少なく発芽率も低かった第5世代では、親の第4世代の開花期にハダニやアブラムシが発生し、交配や種子生産に悪い影響を与えたと考えられる。

Hata ら⁹⁾、Murakami ら¹⁰⁾はホウレンソウの低シュウ酸品種の育成に雌性間性株を用いた。ホウレンソウは雌雄異株植物なので遺伝形質の固定が難しいが、間性株を利用することで自殖ができ、非常に有用である。

ミンスターランド丸種品種は組織培養において、根集塊からのカルス形成や不定胚集塊の再分化に優れている⁷⁾ので用いたが、今回試験したどの世代にも間性株は出現しなかった。今後、間性株利用を視野に入れて、培養段階の品種選択をしていくことも必要である。

3. 低シュウ酸品種の育成

組織培養で得たホウレンソウの後代のシュウ酸測定の結果(図1~5)から、シュウ酸の測定要因や生育要因での低シュウ酸個体はみられたが、特定の遺伝子変異による低シュウ酸個体は得られなかったと考えられる。

子世代株では、低シュウ酸雌株の子株と高シュウ酸雌株の子株に低シュウ酸の個体が見られた(図2)が、低シュウ酸個体の交配で用いたのは、高シュウ酸雌株の子孫のみとなってしまう(表3)。ここで、低シュウ酸雌株の子孫の兄弟姉妹交配を行うべきだったと考える。次の孫世代では、コントロールのシュウ酸含量付近の個体数をピークにした分布を示した(図3)、このことから孫世代で特別な低シュウ酸の遺伝子を得られなかつ

たと考えられる。次の第4世代では、低シュウ酸側に個体数のピークがずれた(図4)が、これは測定、環境要因によるものではないかと考えられる。第5世代は非常に個体数が少なくなっており、低シュウ酸ではあった(図5)が、測定時期が早かった影響ではないかと考えられる。

Murakami ら¹⁰⁾は化学変異原のエチルメタンスルホン酸を種子に処理することで、低シュウ酸系統を作出することに成功した。

本研究では組織培養におけるカルスの変異を利用して育種に取り組んだが、組織培養系の確立に時間がかかり、種子に変異処理する方が効率的であったと考える。しかし、無菌培養系でのホウレンソウ培養は、今後遺伝子の保存や遺伝子組み換え、また生理的な研究にも応用できる可能性もある。

今回は培養系から作成した株より低シュウ酸の遺伝子変異は見つけられなかったが、選抜方法を改善し、計画的な交配を行っていくことで、新たな低シュウ酸系統を見つけれられる可能性はあると考える。

謝辞

ホウレンソウの交配について御助言くださいましたタキイ種苗の茂田勝美氏に感謝いたします。

本実験の一部を担当された専攻生の野崎順子さん、松山渚さん、石井佑璃さん、川合理沙さん、鶴飼奈々絵さん、松原奈緒さん、大木佑実さん、川口仁美さん、中村侑莉香さん、前本学助手の市原由花理さんに感謝します。

参考文献

- 1) 香川彰, ホウレンソウの低シュウ酸含量品種育成に関する研究 (I) —シュウ酸含量に及ぼす生態条件の影響について—, 岐阜女子大

学紀要, 16, 1987, 13-19

- 2) 香川彰, ホウレンソウの低シュウ酸含量品種育成に関する研究(Ⅱ) —シュウ酸含量に及ぼす栽培条件の影響について—, 岐阜女子大学紀要, 17, 1988, 1-6
- 3) 太田和子・香川彰, ホウレンソウの低シュウ酸含量品種育成に関する研究(Ⅲ) カルスのシュウ酸含量におよぼす光条件の影響について, 岐阜女子大学紀要, 21, 1992, 31-34
- 4) 太田和子・香川彰, ホウレンソウの低シュウ酸含量品種育成に関する研究(Ⅳ) 実生の子葉, 根切片からの植物体再分化について—, 岐阜女子大学紀要, 25, 1996, 121-126
- 5) 香川彰・太田和子, ホウレンソウの低シュウ酸含量品種育成に関する研究(Ⅴ) —花粉のX線照射が交雑後代のシュウ酸含量に及ぼす影響について—, 岐阜女子大学紀要, 26, 1997, 59-61
- 6) 太田和子・香川彰, ホウレンソウの低シュウ酸含量品種育成に関する研究(Ⅵ) —根集塊からの植物体再分化について—, 岐阜女子大学紀要, 28, 1999, 19-23
- 7) 太田和子, ホウレンソウの低シュウ酸含量品種育成に関する研究(Ⅶ) —順化および紫外線照射株の育成について—, 岐阜女子大学紀要, 45, 2016, 11-21
- 8) 香川彰, 高品質ホウレンソウの栽培生理, いしずえ, 1997, 74-84
- 9) Hata N., Murakami K., Yoshida Y., Masuda M., Tanaka A., Shikazono N. and Hase Y., Mutagenesis in Gynomonocious Spinach (*Spinacia oleracea* L.) Plants and Selection of Low Oxalate Variants, Scientific Reports of the Faculty of Agriculture Okayama University, 95, 2006, 21-28
- 10) Murakami K., Edamoto M., Hata N., Itami Y. and Masuda M., Low-oxalate Spinach Mutant Induced by Chemical Mutagenesis, J. Japan. Soc., 78 (2), 2009, 180-184