

ヒオウギの組織培養による大量増殖

(第1報)

苗条原基誘導と植物体再生*

浦上好博・前田浩典**・高木和彦・貞野光弘***

Study on the mass propagation by tissue culture in *Belamcanda chinensis* I
Induction of shoot primordia and plant regeneration
Yoshihiro URAKAMI, Hirohumi MAEDA, Kazuhiro Takagi and Mitsuhiro Sadano

要 約

浦上好博・前田浩典・高木和彦・貞野光弘(1992): ヒオウギの組織培養による大量増殖
(第1報)苗条原基誘導と植物体再生. 徳島農試研報, (28): 22 ~ 29

ヒオウギの組織培養による優良種苗大量増殖技術の開発を図るため, 苗条原基の誘導と植物体の再生について検討し, 次の結果を得た。

苗条原基誘導の培地にはBA2.0mg/添加のMS液体培地が好適であり, 苗条原基集塊の維持, 増殖にも誘導と同じ培地が適した。

苗条原基集塊からの植物体再生培地としてはBA0.2mg/l添加のH寒天培地が好適で, 苗条原基集塊の切片を固体培地に植え付けると, 速やかに苗条が分化し, 培養開始50 ~ 60日後には1培養切片当たり4本程度の移植可能な小植物体を得られた。

0.3mm程度の大きさの茎頂を摘出し, 苗条原基法で培養することによりウイルスフリー個体が高率で得られると推察された。

キーワード: ヒオウギ, 組織培養, 大量増殖, 再生, ウイルスフリー

はじめに

日本古来から切り花として利用されているヒオウギは徳島県の特産花きであり, 全国一の生産量を誇る。

本県のヒオウギ栽培は, ウイルス病の多発により株分け栽培から実生栽培に転換した。しかし, 実生栽培では雑種性が強いために, 次代の草姿, 花色, 開花時期等に形質分離が見られ, 現地では不良株が多発し, 切り花形質の不均一による品質低下が問題となっている。

このような事情から, 組織培養による優良形質を有する個体のウイルスフリー化と大量増殖に期待が寄せられているが, ヒオウギの組織培養については報告が見あたらない。

そこで, ヒオウギの組織培養による優良種苗大量増殖技術の開発を図るため, 急速大量増殖が可能で, かつ遺伝的安定性が高いとされる苗条原基法^{6),7)}の適用を1986年から1990年までの5年間検討した。その結果, 苗条原基の作出と植物体の再生が可能となり, 実用化の見通しを得たのでその概要を報告する。

材料および方法

1 苗条原基の誘導

1) 基本培地と植物ホルモンの検討

基本培地はMurashige & Skoog培地⁴⁾(シヨ糖濃度3%, 以下MS培地), 1/2濃度に希釈したMS培地(シヨ糖濃度3%, 以下1/2MS培地), GAMBORGのB5培地¹⁾(シヨ糖濃度2%以下B5培地), 1/2濃度に希釈したB5培地(シヨ糖濃度2%, 以下1/2B5培地), ハイボネックス培地(ハイボネックスN-P-K=6.5-6-19, 3g/l, シヨ糖濃度2%, 以下H培地), 1/2濃度に希釈したH培地(シヨ糖濃度2%, 以下1/2H培地)の6処理区の

液体培地を用いた。これに添加する植物ホルモンとして、MS培地には無添加区、NAA(a-ナフタレン酢酸)とBA(ベンジルアデニン)をそれぞれ0.2mg/l添加区、BAのみ2.0mg/l添加区を設け、その他の基本培地には無添加区とBAのみ2.0mg/l添加区を設定した。培地は直径25mmの平底試験管に20mlずつ分注して滅菌した。

材料はビニルハウス内で栽培中の在来ダルマ系統の根茎頂芽を供試した。材料の殺菌は、オスバン(逆生石鹼)1%溶液に5分間浸漬した後、有効塩素1%の次亜塩素酸ナトリウム溶液に5分間浸漬し、さらにクリーンベンチ内で70%エタノール液に2~3秒間浸漬し、滅菌水で3回洗浄した。茎頂は実体顕微鏡下で葉原基を1,2枚付けて0.3~0.5mmの大きさに切り取り、各試験管の培地中に1個ずつ沈めた。1処理区の供試個体数(試験管数)は5個とした。培養はドラムの直径90cmの回転培養機で1分間に2回転、室温24℃、上辺17,000lx、下辺550lxの連続照明条件下で行った。培養36~39日後に培養茎頂の生育を調査した。

2) 植物ホルモンの種類と濃度の検討

培地は基本培地としてMS液体培地(ショ糖3%)を用い、これに植物ホルモンとしてNAAとBAを第2表に示す濃度で組み合わせて添加した合計9処理区を設定した。1処理区の供試個体数は5個とした。pHの調整、培地の分注、滅菌、茎頂の摘出、置床方法および培養方法は1)の試験に準じた。培養36日後に生育調査を行った。

2 苗条原基の維持、増殖

1)基本培地の種類と濃度の検討

基本培地は第3表に示すように1)の1)の試験で用いた培地と同じ3種類の基本培地を標準濃度と1/2濃度に希釈した6処理区の液体培地を用い、BAを2.0mg/l添加し、ショ糖をMSおよび1/2MS培地は3%、その他培地には2%加え、pHを5.7に調整し、直径25mmの試験管に15mlずつ分注し、滅菌した。

材料はBA2.0mg/l添加のMS培地で誘導、増殖させた苗条原基集塊を用い、3mm角(約10mg)程度の大きさに分割し、各試験管の培地中に1切片ずつ沈めた。1処理区の供試切片数は4切片とした。培養方法は1)の1)の試験に準じた。

培養32日後に苗条原基集塊の維持、増殖状況を調査した。

3 苗条原基からの植物体再生

1) 基本培地の種類と濃度の検討

基本培地はMS、B5、H培地および各々の1/2、1/4濃度に希釈した9処理区の培地を用い、2%のショ糖と0.8%の寒天を加え、pH5.7に調整し直径10mmの試験管に8mlずつ分注し、滅菌した。

材料はBA2.0mg/l添加のMS培地で誘導、増殖させた苗条原基集塊を用い、3mm角程度の大きさに分割し、各試験管の培地上に1切片ずつ置床した。1処理区の供試切片数は10切片とした。培養は24℃、5,500lxの16時間照明の条件下で静置培養し、培養60日後に生育調査を行った。

2) 植物ホルモンの種類と濃度の検討

基本培地はH培地を用い、BAとNAAを第5表の濃度となるよう添加し、2%のショ糖と0.8%の寒天を加えた。pH調整、分注、滅菌、材料、置床方法、供試個体数および培養方法は1)の試験に準じた。培養50日後に生育を調査した。

4 再生個体の特性調査

苗条原基集塊から再生した個体の特性を調査するため、1987年7月23日に在来ダルマ系株の茎頂についてBA2.0mg/lを含むMS液体培地に置床し、苗条原基集塊を誘導、増殖させ、同年12月14日に3mm角程度に分割しBA0.2mg/lを含む1/2MS寒天培地で再生させた苗を用い、翌1988年4月20日にフラスコから出し、順化室で育苗した後、生育の進んだ8個体を18cm鉢に植え付け、温室内で生育開花特性を観察した。

その後、優良系統の大量増殖と併せてウイルスフリー化を確認するため、1988年10月20日にわずかにウイルス症状の見られる優良ダルマ系親株を供試し、0.3mmの大きさに切り取った茎頂からBA2.0mg/lを含むMS液体培地で苗条原基集塊を誘導させた。約2カ月ごとに同培地で植え継ぎ、増殖させた苗条原基集塊を、1989年9月26日に3mm角程度に分割し、BA0.2g/lを含むH寒天培地で植物体を再生させ、生育した苗条から順次、ホルモン無添加の1/2H寒天培地に植え継いだ。生長した苗は

1990年2月2日にフラスコから

出し、順化室で順化させた後、網室で育苗した。同年12月29日に指標植物への汁液接種法によるウイルス検定を行うため、親株および培養苗170個体の中から任意に抽出した5個体の汁液を *Chenopodium amaranticolor*, *Datura stramonium*, *Nicotiana glutinosa*, センチコウおよびツルナの幼葉に接種し病徴をみた。

試験結果

1 苗条原基の誘導

1) 基本培地と植物ホルモンの検討

培養茎頂の生育状況を第1表に示した。BAを単独2.0mg/l添加したMS培地に苗条原基集塊および早生分枝と呼ばれる小植物体、多芽体の混成した集塊が誘導され、1/2MS培地に苗条原基と早生分枝の混成した集塊が誘導された。

第1表 基本培地およびホルモンがヒオウギ茎頂生育に及ぼす影響

基本培地	添加ホルモンおよび濃度(mg/l)		
	NAA0+BA0	NAA0.2+BA0.2	NAA0+BA2.0
MS	PB 1/4+ D 3/4	PLB 3/4 D 1/4	SP 2/5 PB(+SP)1/5 PB 2/5++
B5	D 4/4	-	PB 4/5+++ D 1/5
H	D 5/5	-	PB 3/5++ D 2/5
1/2MS	PB 1/5 D 4/5	-	PB(+SP)2/5 PB 3/5
1/2B5	PB 2/5 D 3/5	-	PB 5/5++++
1/2H	D 5/5	-	PB 1/4 D 3/4

注) 1.SP: 苗条原基集塊 PB: 早生分枝(小植物体または多芽体) PLB: プロトコーム状に肥厚した集塊 D: 枯死または変化なし C: カルス

2.(+)は部分的に形成されたことを示す

3.形成個体数/置床個体数(汚染個体は除く)

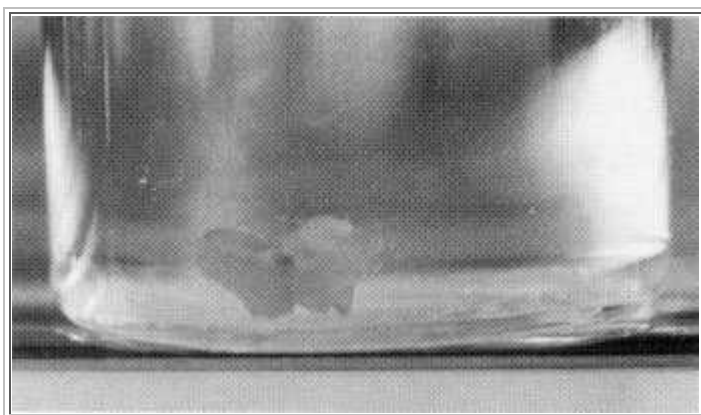
4.組織の個体別褐変程度(枯死個体は除く)を+:褐変軽 ++:褐色中 +++:褐変甚とした

5.-は設定なし

6.培養36~39日後に調査した

苗条原基集塊は表面が滑らかで、やや角張ったドーム状の小突起を多数有する淡横緑色コンパクト状の集塊であった。苗条原基集塊の薄切片を見るかぎり、突起部分には最外層の細胞がほぼ均等な大きさの細胞によって層状に形成されている部分が見られ、葉原基は分化していないように観察された。それが自己増殖して集塊を形成していくように観察された(第1図)。

各培地の標準濃度および1/2B5培地では、形成された早生分枝がわずかに褐変していた。



第1図 形成初期のヒオウギ苗条原基集塊
注) 左部分は生長した葉原基 培養35日後

2) 植物ホルモンの種類と濃度の検討

培養茎頂の生育状況を第2表に示した。苗条原基はNAAを添加した培地では誘導されず，BA単独2.0, 4.0mg/l添加培地で誘導された。しかし，BA単独で0.2, 4.0mg/lを添加した培地では半数以上の茎頂が枯死し，苗条原基集塊がやや褐変した。

第2表 ホルモンの種類・濃度がヒオウギ茎頂の生育に及ぼす影響

N(mg/l)	BA濃度(mg/l)					
	0.2		2.0		4.0	
0	PB	1/5+	SP	1/5	SP	2/5+
	D	4/5	PB(+SP)	1/5	D	3/5
			PB	3/5	PB(+C)	
0.02	PB(+C)	2/5	PB(+PLB,C)	1/5	PB(+C)	3/5
	PB	1/5	PB(+C)	1/5	PB	1/5
	D	2/5	PB	2/5	D	1/5
			D	1/5		
0.2	PLB(+C)	4/5	PB(+PLB,C)	1/5	PLB(+C)	1/5
	C	1/5	PB(+)	1/5	C	2/5
			C	2/5	D	2/5
			D	1/5		

注) 1.記号等は第1表に準ずる

2.培養36日後に調査した

3.基本培地はMSとした

NAAを添加した培地ではカルスやプロトコム状に肥厚した集塊が形成されたが，NAA無添加培地ではこれらの集塊の形成を認めなかった。

2 苗条原基の維持，増殖

1) 基本培地の種類と濃度の検討

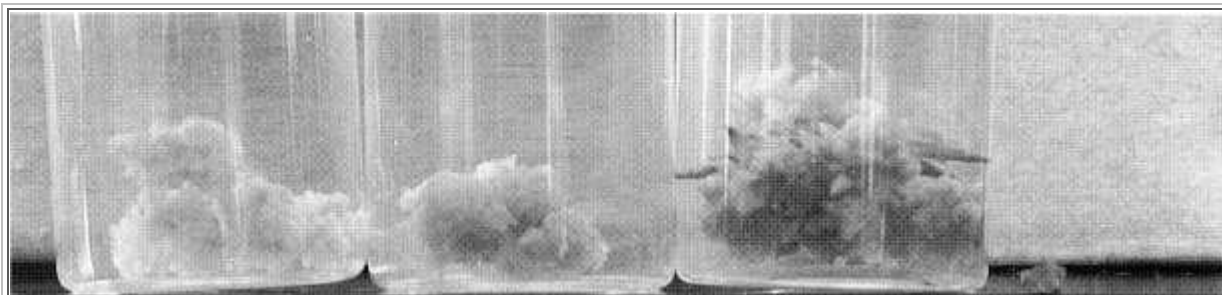
苗条原基集塊の維持，増殖状況を第3表に示した。苗条原基誘導時の培地と同じMS培地では苗条原基の形態が維持され，培養32日後には生体重で約60倍に増殖した。しかしMS以外の培地では緑色が濃くなるとともに集塊表面の突起が大きくなり部分的に葉原基や苗条の分化が観察され，苗条原基の形態の維持は困難であった(第2図)。

第3表 基本培地の種類と濃度がヒオウギ苗条原基集塊の維持，増殖に及ぼす影響

基礎培地の種類	種塊の生体重(g)	集塊表面の突起または苗条の最大長(mm)	集塊の色

MS	0.65	1.4	淡黄緑
B5	0.55	1.5	緑味の淡黄緑
H	0.90	5.3	黄緑(葉先赤褐変)
1/2MS	0.55	2.0	B5よりやや緑濃い淡黄緑
1/2B 5	0.59	2.8	1/2MSよりやや緑濃い淡黄緑
1/2H	1.01	4.9	黄緑(葉先赤褐変)

注) 置床切片の重さ薬10mg, 数値は4切片の平均値, 培養32日に調査した



第2図 ヒオウギ苗条原基集塊の維持, 増殖に及ぼす基本培地の影響

注) 培養32日後, BA2.0mg/l添加培地

集塊の褐変は, H培地および1/2H培地で分化した苗条の葉先が赤褐変した程度であった。苗条原基集塊は, 分割, 植え継ぎせずに回転培養を続けると試験管いっぱいが増殖し, 集塊が試験管の中で回転しなくなると緑色が増し, 部分的に濃緑色となり(第3図), やがてその部分から葉原基の分化が観察された。



第3図 正常に増殖しているヒオウギ苗条原基集塊(左)と試験管の中で回転しなくなり葉原基の分化を始めた苗条原基集塊(右)

3 苗条原基からの植物体再生

1) 基本培地の種類と濃度の検討

苗条原基集塊からの苗条の分化状況を第4表および第4図に示した。MS培地では置床したすべての切片が褐変枯死したが, MS培地以外の培地では置床10日後頃から多数の苗条の分化が観察された。置床60日後において, 移植作業が容易に行えると思われる草丈1cm以上に生長した苗条数を1切片当たりの本数でみると, H培地が最も多い4.6本であった。苗条の最大草丈および最大根長, 発根本数は1/2Hが最も優った。

第4表 基本培地の種類, 濃度がヒオウギ苗条原基からの植物体再生に及ぼす影響

基礎培地	草丈1m以上の苗条数	苗条の最大長(m)	最大根長(m)	発根本数(本)	褐変枯死切片数
MS	-	-	-	-	10/10
1/2MS	1.5	2.3	0.1	0.5	5/10
1/4MS	0.3	1.0	0.9	1.7	0/10
B5	3.8	1.7	0.7	0.2	4/10
1/2B5	0.4	0.7	0.5	0.2	1/10
1/4B5	0.4	0.7	0.7	0.9	1/10
H	4.6	1.8	0.8	0.9	3/10
1/2H	2.0	2.6	2.7	2.6	3/10
1/4H	1.0	1.3	1.2	1.1	0/10

注) 数値は褐変枯死切片を除いた切片の平均値, 培養60日後に調査した



第4図 ヒオウギ苗条原基集塊からの植物体再生に及ぼす基本培地の影響
注) 培養60日後, ホルモン無添加培地

2) 植物ホルモンの種類と濃度の検討

苗条原基集塊からの苗条の分化状況を第5表に示した。置床50日後の草丈1cm以上の苗条数(1切片あたり)はBA0.2mg/l添加培地が最多の4.0本で, 苗条の最大長も同培地が最長であった。

第5表 ホルモンの種類, 濃度がヒオウギ苗条原基からの植物体再生に及ぼす影響

ホルモン濃度 NAA+BAmg/l	草丈1cm以上の苗条数	苗条の最大草丈(cm)	最大根長(cm)	発根本数(本)	褐変枯死切片数
0 +0	3.0	2.1	1.1	2.1	1/10
0.02+0	2.5	1.7	0.4	1.1	0/10
0.2 +0	3.9	1.6	1.7	5.8	0/10
0 +0.2	4.0	2.7	0.5	0.5	0/10
0.02+0.2	2.1	1.3	0.1	0.3	0/10
0.2 +0.2	3.1	2.1	0.7	1.2	0/10
0 +2.0	2.5	1.5	-	-	0/10
0.02+2.0	3.8	2.1	-	-	0/10
0.2 +2.0	2.4	1.5	-	-	0/10

4 再生個体の特性調査

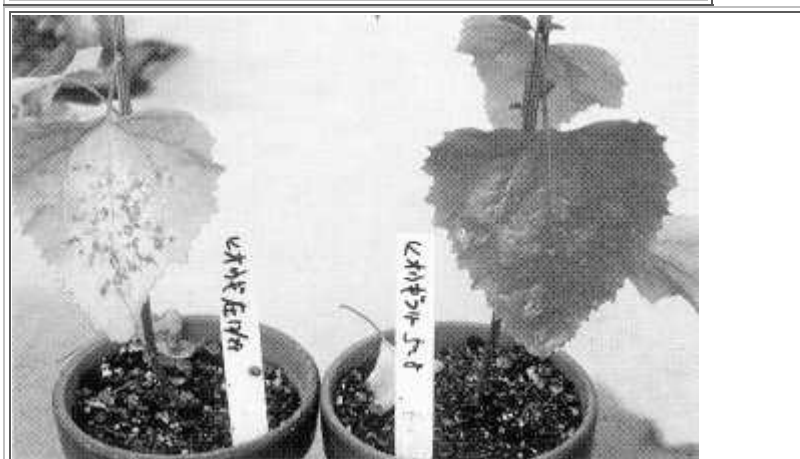
最初に苗条原基集塊から再生, 苗化させた株は1989年3月に第5図のとおり開花した。わずか8株で

はあるが、草姿、花形および花色などの形態はほぼ同一であり、これらの株には形質の変異は見られないと観察された。

次いで行ったウイルス検定では、親株の汁液を接種したCamaranticolorの葉のみに明瞭なLocal lesionを生じたが(第6図)、その他の検定植物には病徴を示さなかった。培養苗め場合は、供試した5個体ともいずれの指標植物でも病徴を示さなかった。また培養苗170個体の外観観察によってもウイルス症状と思われる病徴は認められなかった。



第5図 苗条原基集塊から再生し、開花したヒオウギ



第6図 指標植物への汁液接種法によるウイルス検定結果

注) 検定植物:C.amaranticolor

左:培養新株の汁液接種業

右:苗条原基から再生した苗の汁液接種業

考 察

Tanaka and Ikedaがキク科のハプロパップスを用いて編み出した苗条原基法は、苗条原基が遺伝的に安定で、高い苗化能と大量増殖能をもっていた。その後、本法はウイルスフリー植物の作出や急速大量増殖の手段として様々な植物に適用されつつある⁷⁾。

本法をヒオウギに適用し、苗条原基の誘導を図るため、基本培地と植物ホルモン濃度を違えた液体培地に茎頂を植え付け回転培養した結果、苗条原基様の集塊はBA単独2.0mg/lを添加したMS培地および1/2MS培地で形成されたが、早生分枝を混成しない苗条原基様の単独の集塊が形成されたのはMS培地のみであった。したがって、ヒオウギ苗条原基様集塊の誘導にはMS培地が適すると考えられた。

谷口・田中⁷⁾は苗条原基の同定法として、ハプロパップスやその他の多くの植物の苗条原基は表面が比較的滑らかなドーム状をなし、これが集まって緑色から淡黄色のコンペーター状の苗条原基集塊を形成し、茎頂と葉原基を備えた早生分枝あるいは表面が柔らかい綿のようなカルスとは異なる集塊であると述べている。また苗条原基集塊の形態は解剖学的に見ると小型の細胞より構成されている一次苗条原基と2層構造をもつ二次苗条原基からなるとしている。Tanaka and Ikeda⁶⁾によると苗条原基は、

最初は茎頂ドームの先端部から側方へ少し寄った位置にドーム状の小突起として形成されるとしている。

筆者らが誘導したヒオウギの苗条原基様集塊は、淡黄緑色で、やや角張ってはいるがドーム状の小突起を有するコンペーター状を呈していること、表面が滑らかでありカルスとは異なること、最外層の細胞が層状に形成されていること、葉原基は認められないこと、茎頂ドームからすこし下がった位置に最初の苗条原基が形成されることなど形態的な特徴が苗条原基に類似していることから、苗条原基集塊であると考えられる。なお今回は苗条原基集塊の解剖学的な観察は行っていないので、一次、二次苗条原基の区別はできなかつた。今後さらに詳細な観察が必要であろう。

苗条原基が誘導される適正ホルモン濃度は植物によって異なるとされる¹⁾。MS培地を用いヒオウギ苗条原基が誘導されるホルモン濃度を検討した結果、BA単独2.0, 4.0mg/l添加培地のみで誘導された。しかしBA4.0mg/l添加培地では茎頂や苗条原基集塊が枯死、褐変しやすいので、BA2.0mg/l添加がその適正濃度であると考えられる。

岡田ら⁵⁾がラッキョウでBA, NAAを含むMS, B5培地で誘導した苗条原基集塊は、その後苗条に分化し、同一培地で維持、増殖できなかつたので、培地のホルモン濃度を検討した結果、苗条原基の維持、増殖が可能になったと報告している。筆者が今回ヒオウギで作出した苗条原基集塊は、誘導されたBAを含むMS培地でのみ苗条原基集塊の特徴であるコンペーター状の形態が維持されたことから、その誘導と維持、増殖の培地は同一でよいと考えられた。またその増殖倍率は1カ月間で約60倍であった。苗条原基集塊は、MS培地よりも培地成分の希薄な1/2MS培地で誘導、維持されにくい。苗条原基集塊は回転培養を行うかぎり維持、増殖を続けるが、試験管いっぱい増殖し、管内で回転なくなると苗条が分化し始める。これらのことから、ヒオウギ苗条原基の誘導と維持には回転培養が不可欠であるとともに、ある種の濃厚な培地成分が必要と考えられる。従って、苗条原基をより効率的に誘導するためには、今後MS培地の組成を検討する必要があると考えられる。

また最初の苗条原基は葉原基および腋芽が形成される位置に形成されることから、ヒオウギの苗条原基は、回転培養と濃厚な培地成分によって茎頂からの腋芽の分化が抑制された状態で誘導されるとも推察される。

植物体の再生に適する基本培地を検討した結果、草丈1cm以上の苗条数はH培地が最も多かったことから、大量増殖法としての植物体再生の初代培地にはH培地が適すると考えられる。また今後の検討を要するものの本試験の結果でみると、移植用の培地としては苗条の生長と発根の優れる1/2H培地が適すると思われる。

次にH培地を用いて植物体再生に適するホルモン濃度を検討した結果、草丈1cm以上の苗条数、苗条の最大長ともBA0.2mg/l添加が最も優ったことから、植物体再生の初代培地にはBA0.2mg/l添加のH培地が適すると考えられる。また本培地では発根が比較的少ないので、移植作業が省力的に行える。

苗条原基は遺伝的に安定であるとされる⁷⁾が、組織培養により大量に増殖する以上、植物や培養条件の違いによって遺伝変異を生ずる可能性があることは否定できないと思われる。最初に苗条原基集塊には外観観察から判断するかぎり、変異株は発生していないと思われた。しかし、この調査では個体数が少なかつたので、その後大量の苗を増殖し、現在その諸特性を調査中である。

わが国でヒオウギに発生するウイルス病としては、岩木²⁾によりインゲン黄斑モザイクウイルス(以下BYMV)、キュウリ・モザイク・ウイルスが、山本・大畑⁸⁾によりTomato Spotted wilt Virusが報告されている。今回ウイルス検定に供試した親株はC.amaranticolorのみにcallesionalを生じた。前記2報告によると、供試した指標植物のうちCamaranticolorのみに病徴を生ずるウイルスはBYMVだけである。従って、供試した親株に感染していたウイルスはBYMVであると考えられた。これに対し、培養苗の場合はいずれの指標植物でも病徴を示さなかつた。さらに外観観察でもウイルス症状は認められないことから、茎頂摘出時点みれば培養過程でウイルスが除去され、ウイルスフリー苗が獲得できたものと推察された。

ヒオウギにおいてBYMV以外のウイルスの除去が可能であるか否かは未確認であるが、0.3mm程度の小さい茎頂を培養するかぎり、今回同様ウイルスが除去される可能性は高いと思われる。

以上のように、本苗条原基法の利用により、ヒオウギの大量増殖が可能であることが明らかとなつた。

さらに、これまでのヒオウギの栄養繁殖法は繁殖率が低く、かつウイルス病が受け継がれる恐れの高い株分け繁殖および茎ざし繁殖に限る⁴⁾とされていたが、本苗条原基法を利用することによって、ウイルスフリーの優良系統苗を大量に増殖することが可能と考えられる。

しかし、同一条件で培養した場合でも、苗条原基集塊の形成率、増殖率、褐変程度および植物体の再生状態等に違いがあり、培養の難易度は供試材料の生育状態や系統、個体間差によるところも大き

いと考えられることから、供試材料の検討も含め今後さらに安定的でかつ効率的な培養技術の確立を検討する必要がある。

摘 要

ヒオウギの組織培養による優良種苗大量増殖技術の開発を図るため、苗条原基の誘導と植物体の再生について検討した。

- 1 苗条原基誘導の培地にはBA2.0mg/l添加のMS液体培地が好適であった。
- 2 苗条原基集塊は原基誘導と同じ培地で維持、増殖される。1カ月間の増殖倍率は生体重で約60倍であった。
- 3 苗条原基集塊からの植物体再生培地としてはBA0.2mg/l添加のH培地が好適で、苗条原基集塊の切片を寒天培地に植え付けると、速やかに苗条が分化し、培養開始後50～60日目に、1培養切片当たり4本程度の移植可能な小植物体が得られた。
- 4 0.3mm程度の大きさの茎頂を摘出し、苗条原基法で培養することにより、ウイルスフリー個体が高率で得られると推察された。

引用文献

- 1) GAMBORG, O.L., R.A.MILLER and A.OJIMA (1968): Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, (50): 151 ~ 158.
- 2) 岩木満朗(1973): ヒオウギのウイルス症状株から分離された病原ウイルスについて. *日植病報*, 39(3): 217.
- 3) 前田浩典・住友昭利(1982): ヒオウギに関する研究. 第6報. 茎さし繁殖と挿し木苗の栽培適応性. *徳島農試研報*, (20): 37-42.
- 4) MURASHIGE, T. and F.SKOOOG(1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473 ~ 497.
- 5) 岡田昌久・松本満夫(1990): ラッキョウにおける苗条原基法の適用. *高知園試研報*, (5): 1 ~ 6.
- 6) TANAKA, R. and H. IKEDA (1983): Perennial maintenance of annual *Haplopappusgia-cilis*(2n=4) by shoot tip cloning. *Japanese Journal of Genetics*, (58): 65 ~ 70.
- 7) 谷口研至・田中隆荘(1988): 苗条原基利用による種苗の大量増殖法. *農及園*, 63(11): 49 ~ 53.
- 8) 山本孝猛・大畑貫 (1977): ヒオウギ(*Belamcanda chinensis* DC.)に発生したTomato Spotted Wilt Virus. *四国農試報*, (30): 39 ~ 47.