

## テッポウユリ ‘ジョージア’ のりん片培養によるカルス誘導とカルスからの ウイルスフリー子球の生産

徐 品三・新美芳二・荒木 肇

新潟大学農学部 950-2181 新潟市五十嵐2の町 8050

Production of Virus-free Bulblets from Callus Induced from Scale Culture of *Lilium longiflorum* ‘Georgia’

Pin-San Xu, Yoshiji Niimi and Hajime Araki

Faculty of Agriculture, Niigata University, Ikarashi 2-8050, Niigata 950-2181

### Summary

When *Lilium longiflorum* ‘Georgia’ callus was induced from bulblet-scales in MS (Murashige and Skoog, 1962) medium supplemented with 5.0  $\mu$ M picloram, callus growth was more vigorous in liquid than on a solid medium. When the calli were transplanted to MS medium and 1/2 MS (half strength inorganic elements and full strength MS organic elements), the frequency of shoot formation (percentage of callus regenerating shoot and number shoot per callus) was higher in the solid than in the liquid medium. However, the shoot forming capacity decreased as the number of subculturing was increased. Bulblets regenerated from subcultured calli were stored at 4 °C for 8 weeks and then transplanted to soil. After a 6-month cultivation in soil, when scaly leaves were indexed for viruses, the number of infected bulblets decreased in those regenerated from calli subcultured five times. Cucumber mosaic virus (CMV) was not detected. The addition of antiviral chemicals (DHT, ribavirin) in the regeneration medium (MS medium without growth regulators) had little influence on the rate of shoot regeneration from calli but increased the rate of virus-free bulblets. The addition of 50  $\mu$ M DHT eliminated CMV and LSV effectively to reduce infection rate of bulblets to 19% even after 6-months cultivation in a greenhouse.

**Key Words:** antiviral chemicals, callus culture, *Lilium longiflorum*, shoot regeneration.

### 緒 言

ユリ球根の生産において効率的なウイルスフリー株作出とその増殖体系の確立は解決すべき重要な課題の一つである。これまでユリのウイルスフリー球根の生産は茎頂培養 (Asjes ら, 1974) や抗ウイルス剤処理 (Blom-Barnhoorn・van Aartrijk, 1985; 徐・新美, 1999) などの方法が有効であると報告されている。茎頂培養では、茎頂部分の摘出の煩雑さ、ウイルスフリー球根生産の低効率等の問題点がある。また、りん片培養時の抗ウイルス剤処理により再生子球でのウイルス検出率は低下するが、圃場へ移植後にはウイルスの検出個体数が増加するという見解も得られている (徐・新美, 1999)。

ウイルスに感染した植物体から誘導されたカルスでは、継代培養の間にウイルス濃度が低下するか、または消失することが認められており (Reinert, 1966)、カーネーション

ン (近藤, 1967) やニンニク (菅原ら, 1979) ではカルスからの再生植物体におけるウイルス濃度の低下が報告されている。ユリではカルス誘導および植物体再生は報告されているが (Priyadarshi・Sen, 1992; Wickremesinhe ら, 1994), その成功例は一部の種・品種に限られ、ウイルスフリー株作出に利用されるまでには至っていない。

本研究では、カルス培養によるユリのウイルスフリー株作出体系の確立を目的として、まずテッポウユリ ‘ジョージア’ のりん片から誘導されたカルスの増殖およびそのカルスからの植物体再生条件を検討した。さらに、再生個体のウイルス検定を行い、ウイルスフリー株作出に対するカルス培養の効果を評価した。またカルス培養時における抗ウイルス剤添加の効果もあわせて調査した。

### 材料および方法

本研究で用いた培養培地はいずれも 30 g・liter<sup>-1</sup> ショ糖を含み、固形培地には 2.5 g・liter<sup>-1</sup> Gelrite を加えた。培養は 24 ± 1 °C、連続照明下で行った。

1999年3月17日 受付. 1999年6月21日 受理.

本研究の一部は文部省科学研究費 (09460017) によって行われた。

# 1. カルスの誘導・増殖およびシュート形成

テッポウユリ‘ジョージア’(*L. longiflorum* ‘Georgia’)のりん片培養 ( $0.1 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$  NAAと  $0.01 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$  BAを添加した MS 培地)によって形成された子球を用いた。形成された子球のウイルス検出には前報(新美ら, 1999)の ELISA 法で調査し, 3 種類のウイルス (LSV, TBV-L と CMV) のすべてが検出された子球を選んだ。これらの子球のりん片が  $5.0 \mu\text{M}$  picloram を添加した MS 固形培地 (1962) で 2 ヶ月間培養された。

りん片切断面に形成されたカルスが分離され, 同一組成の固形培地および液体培地に移植され, 継代培養を行った。継代開始から 1 週間毎にカルスの生体重を計測した。8 週間培養後, カルスを同じ組成の固形または液体の新鮮培地に移植した。その後も 8 週間毎に継代し, 継代 1 回目と同様に 3 と 5 回目のカルスの増殖量を測定した。測定方法はクリーンベンチ内で培養容器からカルスを取り出して重さを計り, 置床時のカルスの重さに対して増殖の割合を計算した。

8 週間ずつ 1, 3, 5 回の継代を行ったカルスは培養終了時の 8 週間後に約  $50 \text{ mg}$  ずつに切り分けて再生培地に移植した。再生培地の組成は MS 培地の無機塩とそれを 1/2 濃度に調整した無機塩 (前者は MS 培地, 後者は 1/2MS 培地と記す) に等倍の MS 培地のビタミン類, およびこれら二つの培地に  $0, 0.5, 5.0 \mu\text{M}$  NAA と  $0, 0.05 \mu\text{M}$  BA を組み合わせて添加した培地を用いた。再生培地移植 10 週間後に各カルスからのシュート形成数を調べた。本実験でのシュートとは葉のみかあるいは葉の基部がわずかに肥大したものをさす。

# 2. 抗ウイルス剤添加培地でのシュート形成

LSV と CMV が検出された培養中の子球りん片を  $5.0 \mu\text{M}$  picloram を添加した MS 培地で培養してカルスを誘導した。そのカルスを,  $0.5 \mu\text{M}$  NAA を含んだ 1/2MS 培地に抗ウイルス剤 DHT(2, 4-dioxohexa-hydro-1, 3, 5-triazine) と ribavirin(Virazole) を 5 または  $50 \mu\text{M}$  添加した培地に置床した。そして培養 10 週間後にカルスからのシュート形成数を調べた。

# 3. 再生子球からのウイルス検定

## 1) 継代カルスから再生したシュートからの子球

再生したシュートをカルスから分離し, 生長調節物質無添加の MS 培地に移植した。培養 8 週間後にこれらの培養物はフラスコに入れたまま,  $4^\circ\text{C}$  で 8 週間低温処理したあとフラスコから取り出し, 水道水でよく洗った。子球は, 根の基部約  $1 \text{ cm}$  を残して切除したあと, バームキュライトの入った鉢に植え, アブラムシによるウイルス感染を防止するために寒冷紗の被覆下で栽培した。6 ヶ月後に葉を採取し, ウイルス検定を行った。ウイルスの検出には間接 ELISA 法 (大木, 1989) を用い, 検出に必要な薬品の調製およびウイルス感染の判定は新美ら (1999) の方法に従った。

## 2) 抗ウイルス剤添加培地で再生したシュートからの子球

抗ウイルス剤添加培地で再生したシュートをカルスから分離し, 生長調節物質無添加の MS 培地に移植した。増大した子球のりん片葉を採取し, ウイルス検定を間接 ELISA 法で行った。これらの子球は新しい培地 (同一組成) でさらに 4 週間培養したあと, フラスコに入れたまま  $4^\circ\text{C}$  で 8 週間低温処理した。低温処理した子球は上述した方法で移植して温室で栽培した。移植 6 ヶ月後, ウイルス検定を再度行った。

## 結 果

# 1. カルスの増殖およびシュート形成

## 1) カルス増殖

液体培地では, 1, 3, 5 回の継代を行ったカルスはいずれも培養 5 週間までほぼ同じ割合で増殖し, 増殖率は  $60\sim 80\%$  であった (第 1 図)。継代 1 回のカルスはその後も生長し, 8 週間培養後のカルスの増殖率は生体重で移植前の約  $200\%$  になった。しかし, 継代 3 回および 5 回のカルスの生長は緩やかになり, 8 週間培養後のカルス増殖率はそれぞれ約  $120\%$  と  $80\%$  であった。

固形培地における培養 5 週間までのカルス増殖速度は,

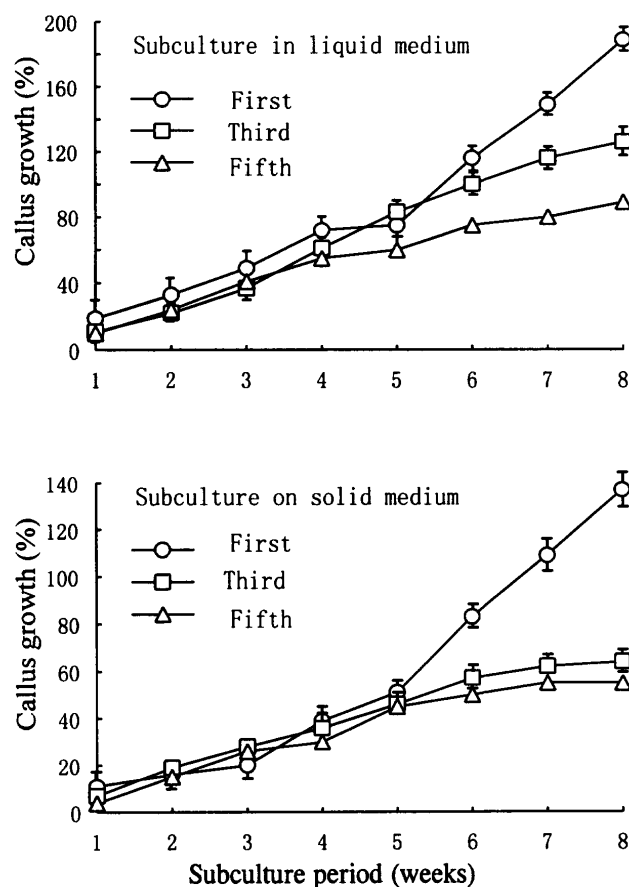


Fig. 1. Relative callus growth rate of *L. longiflorum* ‘Georgia’ subcultured in liquid or on solid MS medium supplemented with  $5.0 \mu\text{M}$  picloram. The ratio of fresh weight in subculture to that at the starting of subculture.

**Table 1.** Effect of MS-strength, NAA and BA concentration on shoot regeneration from calli subcultured different times in *L. longiflorum* 'Georgia'<sup>z</sup>.

| Component of regeneration medium |                |               | Percent of shoot regeneration               |                                |                                |
|----------------------------------|----------------|---------------|---------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| MS medium strength               | NAA ( $\mu$ M) | BA ( $\mu$ M) | First subculture                            | Third subculture               | Fifth subculture               |
| 1/2                              | 0              | 0             | 12.6 $\pm$ 1.9 (1.8 $\pm$ 1.2) <sup>y</sup> | 10.3 $\pm$ 2.0 (2.0 $\pm$ 1.5) | 0                              |
|                                  | 0.5            | 0             | 88.7 $\pm$ 5.3 (4.7 $\pm$ 1.4)              | 53.9 $\pm$ 4.4 (4.5 $\pm$ 2.4) | 35.2 $\pm$ 4.5 (1.4 $\pm$ 1.0) |
|                                  | 0.5            | 0.05          | 12.6 $\pm$ 0.5 (1.2 $\pm$ 0.7)              | 6.8 $\pm$ 1.8 (1.1 $\pm$ 0.4)  | 0                              |
|                                  | 5.0            | 0             | 5.5 $\pm$ 1.7 (0.5 $\pm$ 0.4)               | 0                              | 0                              |
|                                  | 5.0            | 0.05          | 0                                           | 0                              | 0                              |
| 1                                | 0              | 0             | 0                                           | 0                              | 0                              |
|                                  | 0.5            | 0             | 53.9 $\pm$ 9.7 (1.8 $\pm$ 0.9)              | 37.3 $\pm$ 6.6 (1.5 $\pm$ 1.2) | 27.3 $\pm$ 8.2 (0.7 $\pm$ 0.4) |
|                                  | 0.5            | 0.05          | 0                                           | 0                              | 0                              |
|                                  | 5.0            | 0             | 7.6 $\pm$ 0.9 (1.0 $\pm$ 0.7)               | 0                              | 0                              |
|                                  | 5.0            | 0.05          | 0                                           | 0                              | 0                              |

<sup>z</sup> Calli were cultured for 10 weeks. Each treatment consisted of 4 flasks, each flasks contained 7 calli.<sup>y</sup> Values indicate means  $\pm$  standard error. Parenthesized figures represent the regenerated shoot/ number of clump cultured callus.

液体培地と同様に継代 1, 3 と 5 回のカルス間に差異はほとんどなく, 40~50%の増殖率を示した. 継代 1 回のカルスはその後も生長したが, 8 週間後の増殖率は約 140%で, 液体培地のカルスと比べ低かった. 継代 3 回および 5 回のカルスはいずれも 5 週間以降生長が緩やかになり, 生長は培養 6 週間後にほとんど停止した.

## 2) シュート形成

シュートの再生率およびカルス当たりの平均シュート数は, いずれの NAA と BA の組合せにおいても 1/2MS 培地で培養したカルスが MS 培地で培養したものよりも多かった (第 1 表). 特に 0.5  $\mu$ M NAA 単独添加区ではシュート形成率が高く, 1/2MS 培地では 88.7%を示した. この培地上での形成率は継代数が多いカルスにおいても相対的に他より高かった. しかし, 継代数が多くなると形成率は低下し, 継代 5 回のカルスでは 35.2%であった. さらに, 0.05  $\mu$ M BA を添加した培地ではシュート形成率は大きく低下し, 初代培養でも 12.6%となった.

継代数の増加につれて各処理区ともシュート形成率は低くなり, 継代 5 回のカルスでは 0.5  $\mu$ M NAA の単独添加区のみでシュートが形成された.

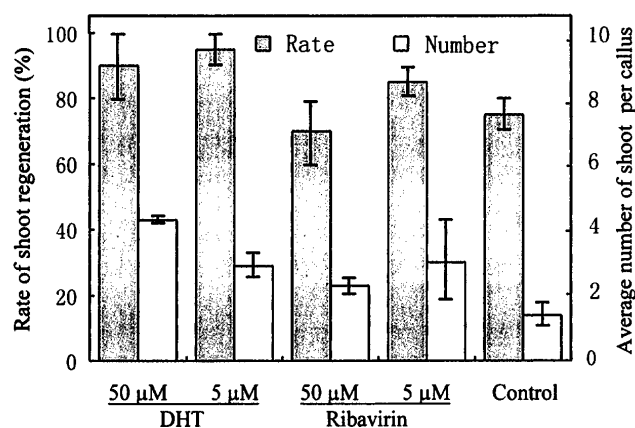
## 2. 抗ウイルス剤添加培地でのシュート形成

DHT と ribavirin を 5 と 50  $\mu$ M それぞれ添加した固形培地で培養したカルスは無添加区と同程度にシュートが形成され, その率はいずれの処理区においても 70%以上であった (第 2 図). カルス当たりの平均シュート数は無添加区より有意に多かった.

## 3. 再生子球からのウイルス検出

### 1) 継代カルスから再生した子球

圃場へ移植して 6 ヶ月栽培した子球におけるウイルスの有無を調査した. 3 種類のウイルス (LSV, TBV-L と CMV) が単独で検出された子球と複数のウイルスが検出



**Fig. 2.** Rate of callus with shoot and average number of shoots per callus in the first subcultured callus of *L. longiflorum* 'Georgia'. The calli were cultured on 1/2 MS medium with or without (control) DHT and ribavirin. All treatments included 0.5  $\mu$ M NAA.

された子球があった (第 2 表). 継代 1 回のカルスからの子球ではウイルス検出率が 65.2%で, 継代 3 回の場合では LSV 単独検出個体数が多く, 検出率は 60%であった. 継代 5 回では 30.8%であり, CMV は全く検出されなかった. ウイルス除去の容易さはいずれの継代培養区においても CMV, TBV-L, LSV の順であった.

### 2) 抗ウイルス剤添加培地で再生した子球

培養終了時に DHT と ribavirin を添加した培地で再生した子球のウイルス検出率は 22~37%であった (第 3 表). 特に DHT 添加区では CMV は全く検出されなかった. 温室に移植 6 ヶ月後の子球では, 5  $\mu$ M DHT と 5 および 50  $\mu$ M ribavirin 添加区から再生した子球の場合, ウイルス検出率は 50~75%となり, 培養終了時より高くなった. 一方, 50  $\mu$ M DHT 添加区からの子球では, ウイルス検出率

**Table 2.** Detection of viruses in bulblets regenerated from subcultured calli of *L. longiflorum* 'Georgia'<sup>z</sup>.

| Callus subculture | No. of bulblets examined | Total no. of virus - detected bulblets (%) | Number of virus - detected bulblets <sup>y</sup> |       |     |           |         |           |               |
|-------------------|--------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------|-----|-----------|---------|-----------|---------------|
|                   |                          |                                            | LSV                                              | TBV-L | CMV | LSV+TBV-L | LSV+CMV | TBV-L+CMV | LSV+TBV-L+CMV |
| First             | 23                       | 15 (65.2)                                  | 5                                                | 1     | 1   | 4         | 0       | 1         | 3             |
| Third             | 30                       | 18 (60.0)                                  | 11                                               | 2     | 1   | 2         | 0       | 2         | 0             |
| Fifth             | 13                       | 4 (30.8)                                   | 1                                                | 0     | 0   | 3         | 0       | 0         | 0             |

<sup>z</sup> Virus detection was made using scaly leaves 6 months after transplanting to soil.<sup>y</sup> LSV, lily symptomless virus. TBV-L, tulip breaking virus-lily. CMV, cucurbit mosaic virus.**Table 3.** Detection of viruses in bulblets regenerated from calli of *L. longiflorum* 'Georgia'<sup>z</sup>.

| Antiviral compounds |                      | Detection of LSV and CMV                |     |     |         |                   |                                             |     |     |         |                   |
|---------------------|----------------------|-----------------------------------------|-----|-----|---------|-------------------|---------------------------------------------|-----|-----|---------|-------------------|
| DHT ( $\mu$ M)      | ribavirin ( $\mu$ M) | Bulblets at the end of in vitro culture |     |     |         |                   | Bulblets grown in a greenhouse for 6 months |     |     |         |                   |
|                     |                      | No. of bulblets                         | LSV | CMV | LSV+CMV | Total infected(%) | No. of bulblets                             | LSV | CMV | LSV+CMV | Total infected(%) |
| 0                   | 0                    | 28                                      | 6   | 4   | 15      | 25 (89)           | 24                                          | 9   | 8   | 1       | 18 (75)           |
| 5                   | 0                    | 22                                      | 6   | 0   | 0       | 6 (22)            | 20                                          | 4   | 3   | 8       | 15 (75)           |
| 50                  | 0                    | 24                                      | 6   | 0   | 0       | 6 (25)            | 16                                          | 3   | 0   | 0       | 3 (19)            |
| 0                   | 5                    | 16                                      | 3   | 2   | 1       | 6 (37)            | 16                                          | 4   | 0   | 6       | 10 (63)           |
| 0                   | 50                   | 24                                      | 3   | 4   | 2       | 6 (25)            | 24                                          | 4   | 5   | 3       | 12 (50)           |

<sup>z</sup> Calli were cultured on 1/2 MS medium with or without antiviral compounds for 8 weeks.

は培養終了時のそれと同程度の 19%であった。

## 考 察

ユリのカルス増殖に関して、テッポウユリのカルス生長は置床後 30~45 日頃まで最大であること (Priyadarshi・Sen, 1992), ユリ交雑胚から形成されたカルスの増殖は培養 60 日間まで維持されるが、その後はほとんど停止する (浅野・明道, 1978) ことが報告されている。本研究でも初代カルスは培養 8 週間まで増殖を続け、前述の結果とほぼ一致した。しかし、継代数が多くなるにつれてカルスの生長は低下し、長期間の培養はカルスの分裂能力の低下を引き起こすことが明らかになった。

ユリカルスの植物体再生は生長調節物質無添加あるいは低濃度オーキシンの添加培地で促進されることが知られている (Priyadarshi・Sen, 1992; Wickremesinhe ら, 1994)。またユリのカルスからの不定芽の分化において、1/2MS 培地は MS 培地より優れていることと、BA の培地添加によって阻害されることは報告されている (浅野・明道, 1978)。本研究においても、カルスからのシュート形成についてはこれらの報告と同様であった。ミヤマスカシユリのカルスは 60 日ごとの 4 回までの継代培養ではその再分化能力はよく維持されること (大垣, 1982) や、雑種ユリ 'Black Beauty' のカルスでは半固形培地で再分化能力を約 15 ケ月間保持できるとの報告 (Stimart ら, 1980) もあるが、本研究に供試したテッポウユリでは 50% 以上の再生率を得るためには 8 週間毎の継代培養で 3 回以

内、すなわち 24 週間以内に再生培地に移植しなければならないことが示された (第 1 表)。

カルス培養によるウイルス除去については、カーネーションのカルスでは 10 回の継代培養でウイルスの大部分が消失し (近藤, 1967), ニンニクのカルスでは継代培養を 5 回行くとウイルス粒子が観察されなくなる (菅原ら, 1979) と報告されている。本研究でもユリカルスの継代数を増加させるにつれて再生子球のウイルス検出率は低くなり、5 回の継代ではウイルス検出率が約 31% となり、特に CMV の除去はタバコカルスからの CMV 除去に関する報告 (Omura・Wakimoto, 1978) とほぼ一致し、ほかのウイルスより容易であった。しかし、カルス培養によるウイルスフリー化はカルス培養期間の長期化によって促進される一方、継代が長くなるにつれ再生率が低下することから、この矛盾を解決する必要がある。

前述の課題の解決法の一つとして抗ウイルス剤の利用の可能性が本研究の結果から示唆された。一般的に抗ウイルス剤はウイルスの増殖を抑制すると同時に、植物の生長阻害も伴うことが指摘されている (平井ら, 1988)。しかし、本研究では再生培地へ 5  $\mu$ M と 50  $\mu$ M の各濃度の DHT および ribavirin を添加しても 'ジョージア' のカルスからの植物体再生は阻害されず (第 2 図), ユリにおいては、ウイルスの増殖が十分抑制される濃度の抗ウイルス剤の培地への添加は、細胞の生長・分化を阻害しないことを示唆している。本研究結果は、また培地に添加する抗ウイルス剤が再生した子球のウイルス検出率の低下に寄与

することを示している。ribavirin添加培地で培養したカルスからの再生子球のウイルス検出率は培養終了時には25~37%となり、無添加区より低かったが、6ヶ月間圃場で栽培した子球のウイルス検出率は50~63%に増加した。この結果は、ユリのりん片培養でribavirinを処理して得られた子球では培養終了時の子球と比べ圃場で栽培後にウイルス検出率が增加する(徐・新美, 1999)という報告と一致する。このウイルス検出株率の増加は、ribavirinの添加により試験管内の外植体のウイルス増殖が一時的に抑制され、ウイルス濃度が検出できない濃度にまで低下するが、その後ribavirinの存在しない条件で栽培することによるribavirinの体内濃度の低下に伴い、ウイルスが再び増殖すると考えられる。一方、DHTのウイルス増殖抑制は尾崎らの報告(1996)と同様に、CMVにおいてその効果は顕著に現れた。50  $\mu$ M DHT添加区から再生した子球を温室で6ヶ月間栽培したあとのウイルス検出率は培養終了時とほぼ同じレベルであった(第3表)。従って、DHTのウイルス増殖抑制効果はribavirinより高いことが示唆された。

以上の結果から、ユリのカルス培養を利用したウイルスフリー球の大量獲得にはカルスからの再生率が維持される継代3回までのカルスを用いるか、りん片培養で形成されたカルスを50  $\mu$ M DHTを添加した再生培地で培養して植物体を獲得するか、あるいは両者を組み合わせた方法を用いるのがよいと考えられる。一方、培養終了時と一定期間栽培したあとの個体のウイルス検定結果が一致することが組織培養によるユリのウイルスフリー球の大量増殖を考えた場合望ましい。しかし、前報(徐・新美, 1999)ならびに本研究の結果では、培養終了時と一定期間栽培したあとのウイルス検定結果は必ずしも一致しないことが示された。この点を解決するには培養終了時のウイルス検定ではELISA法ばかりでなくRT-PCR法(Takamatsuら, 1994)や電子顕微鏡によるウイルス粒子の観察などの方法を併用することも必要となろう。

## 摘 要

テッポウユリ‘ジョージア’のカルス培養によるウイルスフリー個体作出を目的とし、カルス継代および植物体再生条件を検討し、再生した子球のウイルス検定を行った。

1. ‘ジョージア’のカルスは5.0  $\mu$ M picloramを添加したMS培地で継代する間には器官の再分化は起らず、カルス増殖のみであった。しかし、継代数を増加するにつれてその増殖率は低下した。

2. 上述の培地で継代培養したカルスをMS培地と1/2MS培地(無機塩濃度が1/2に希釈され、他の成分は同一濃度)に移植すると、シュートはMS培地よりも1/2MS培地で培養したカルスからよく形成された。長期間継代培養したカルスでも0.5  $\mu$ M NAAの単独添加培地ではシュートを形成したが、その率は継代数の増加につれて低下

した。

3. 再生したシュートから発達した子球を低温処理したあと6ヶ月間圃場で栽培した。これらの植物体からのウイルス検出率はカルスの継代回数の多いカルスから得られた植物体で低く、継代5回の子球のウイルス検出率は約31%となり、CMVは全く検出されなかった。

4. 抗ウイルス剤であるDHTおよびribavirin(5, 50  $\mu$ M)を培地に添加してもカルスからのシュート形成には影響しなかった。それらの添加培地から再生した子球の培養終了時点でのウイルス検出率は、無添加区より低くなった。特に50  $\mu$ M DHTの添加区では温室に移植した6ヶ月後でも培養終了時のウイルス検出率とほぼ同等で、19%であった。

5. ウイルスに感染した‘ジョージア’のりん片から誘導されたカルスを3回以上継代するか、あるいは50  $\mu$ M DHTを含む培地でカルスを培養して植物体を得る方法により、ウイルスフリー個体を効率的に生産できることが示唆された。

謝 辞 本実験を遂行するに当たり、ウイルス抗血清を新潟県園芸研究センターより分譲していただいた。ここに記して感謝の意を表する。

## 引用文献

- Asjes, C. J., M. H. Bunt and D. H. M. van Slogteren. 1974. Production of hyacinth mosaic virus-free hyacinths and lily symptomless virus free lilies by meristem tip culture. *Acta Hort.* 36: 223-228.
- 浅野義人・明道 博. 1978. ユリのカルス利用による苗の増殖. *園学要旨*. 昭53春: 342-343.
- Blom-Barnhoorn, G. J. and J. van Aartrijk. 1985. The regeneration of plant free of LSV and TBV from infected *Lilium* bulb-scale explants in the presence of Virazole. *Acta Hort.* 164: 163-168.
- 平井篤造・四方英四郎・高橋 壮・都丸敬一. 1988. 新編植物ウイルス学. p.278. 養賢堂. 東京.
- 近藤 章. 1967. 保毒カルスの培養と病原性. *日本植物病理学会報*. 33: 102.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-479.
- 新美芳二・権平 正・嚮田圭孝・辻 ひろ. 1999. ほ場で栽培中のユリのLSV, TBV-LおよびCMVのELISA法とDIBA法による検出. *園学雑*. 68: 176-183.
- 大垣晃一. 1982. ミヤマスカシユリの再分化. *園学雑*. 50: 497-502.
- 大木 理. 1989. 酵素結合抗体法によるウイルスの検出. -間接ELISA法とDIBA法-. p.44-49. 獅山慈孝監修. *植物病理学実験マニュアル*. 養賢堂. 東京.
- Omura, T. and S. Wakimoto. 1978. Elimination of viruses

- from plant tissue cultures. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 44: 277-281.
- 尾崎武司・野口総一郎・浜中昭彦・平田明靖・梁川 正. 1996. ヒガンバナ科およびユリ科球根花きのりん葉切片からの子球形成とウイルスの無毒化. *植物組織培養* 13: 153-160.
- Priyadarshi, S. and S. Sen. 1992. A revised scheme for mass propagation of Easter Lily. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 30: 193-197.
- Reinert, R. A. 1966. Virus activity and growth of infected and healthy callus tissues of *Nicotiana tabacum* grown in vitro. *Phytopathology* 56: 731-733.
- Stimart, D. P., P. D. Ascher and J. S. Zagorski. 1980. Plants from callus of the interspecific hybrid *Lilium* Black Beauty. *HortScience* 15: 313-315.
- 菅原祐幸・大澤勝次・我孫子和雄・野場和徳. 1979. ニンニクの組織培養におけるカルスの継代とカルス中のウイルスの消長に関する試験. *野菜試育種年報* (昭和54). 6: 29-45.
- Takamatsu, S., B. N. Lin, H. Furuta and K. Makara. 1994. RT-PCR mediated cloning and sequence analysis of lily symptomless virus coat protein gene. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 60: 487-490.
- Wickremesinhe, E. R. M., E. J. Holcomb and R. N. Arteca. 1994. A practical method for the production of flowering Easter lilies from callus cultures. *Scientia Hortic.* 60: 143-152.
- 徐 品三・新美芳二. 1999. ‘ジョージア’ と ‘カサブランカ’ のりん片培養によるウイルスフリー子球生産への抗ウイルス剤と熱処理の影響. *園学雑*. 68: 640-647.