

胚珠培養による *Spiraea thunbergii* Sieb. と *Spiraea japonica* L. との種間雑種の作出

飯塚正英^{1*}・工藤暢宏¹・木村康夫¹・荻原 勲²

¹ 群馬県園芸試験場 379-2224 群馬県佐波郡東村西小保方 493

² 東京農工大学農学部 183 8509 府中市幸町3-5-8

Interspecific Hybrids between *Spiraea thunbergii* Sieb. ex Blume. and *S. japonica* L. fil. via Ovule Culture

Masahide Iizuka^{1*}, Nobuhiro Kudo¹, Yasuo Kimura¹ and Isao Ogiwara²

¹ Gunma Horticultural Experiment Station, 493 Nishiobokata, Azuma-mura, Sawa-gun, Gunma 379-2224

² Tokyo University of Agriculture and Technology, Faculty of Agriculture, 3-5-8 Saiwaicho, Fuchu, Tokyo, 183-8538

Summary

Reciprocal crosses between *Spiraea thunbergii* Sieb. ex Blume. and *S. japonica* L. fil. were carried out, to incorporate red color to *S. thunbergii*. *In vitro* germination rate of the stored pollen, germination of pollen grains on the stigma, growth of the pollen tubes, and the development of ovule were investigated, in addition ovule culture was tried to obtain interspecific hybrids.

1. Since the flowering time of both species differed, pollen grains of both species were stored dry at -30°C , 5°C , and 20°C . Only the pollen of both species stored at -30°C for 360 days remained viable for crossing.

2. Pollen grains of *S. japonica*, stored at -30°C , germinated well on the stigma of *S. thunbergii*. The pollen tubes elongated rapidly to the ovary as the developing ovules were observed 10 days after pollination. Stored pollens of *S. thunbergii* germinated well on the stigma of *S. japonica*, but whether the pollen tubes reached the ovary it was not confirmed.

3. In the interspecific crosses between *S. thunbergii* (♀) and *S. japonica* (♂), enlarged ovules excised 16 days after pollination were cultured in 1/2MS medium containing $30\text{ g}\cdot\text{liter}^{-1}$ sucrose and $8\text{ g}\cdot\text{liter}^{-1}$ agar. The resulting plantlets seem to be true hybrids between *S. thunbergii* and *S. japonica*, based on several morphological characteristics and the RAPD banding patterns which exhibited the same bands as the parents.

Key Words: interspecific hybrid, ovule culture, pollen storage, *Spiraea*.

緒 言

Spiraea 属は北半球の温帯と亜寒帯に約 120 種が認められているが、日本にはユキヤナギやシモツケ等の 10 種が山地の半裸地から低地の湿地等に自生する (大橋ら, 1989). ユキヤナギ (*Spiraea thunbergii* Sieb. ex Blume) は中国原産とされるが、本州 (関東以西), 四国, 九州の山地の河岸岸壁や岩礫地に自生が見られる (五井, 1985). 花は白色で微香を有し, 前年枝に 2~7 花が集まって腋生の散形花序をつくり, 3~5 月に開花する. ユキヤナギは *Spiraea* 属の中では茎葉と花がもっとも美しい種の一つで, 庭木や切花として古来より重要な花木として植栽されている. また, 耐寒性, 耐暑性があり, 生育も早

いので下草や垣根などにも利用されている. ユキヤナギの品種は実生選抜による '蒲田早生', '安行早生', '寒咲' など数品種が知られ, 開花日や紅葉の時期, 枝の伸長程度に相違が認められる (五井, 1988). 一方, シモツケ (*Spiraea japonica* L. fil.) は日本原産で本州, 四国, 九州の山地に自生し, 当年枝の先端に, 4~6 mm の淡紅色の花を散房花序に付け, 5~7 月に開花する. シモツケは形態的変異に富み, 株立や花色が多形であるが, 品種は少なく, おもに庭木, 切り花, 鉢花として利用されている.

ユキヤナギとシモツケの雑種作出例は, これまでに報告されていないが, 花岡 (1986) はユキヤナギへのシモツケの花色 (赤色) の導入は, ユキヤナギの花色や花形の多様化に必要であると指摘している. そこで, 著者らは予備実験として 1997 年に両種を交雑したが種子が獲得できなかった (飯塚・工藤, 1998). この要因としては花粉の受精能力の低下 (Niimi・Shiokawa, 1992), 交雑に用い

2000 年 11 月 24 日 受付. 2001 年 5 月 1 日 受理.

*Corresponding author.

た花粉管の異常行動や伸長停止 (Asano, 1980; Asano, 1981), 胚珠の早期退化 (Hwang ら, 1992; Ishizaka・Uematsu, 1992) などが考えられる。一方, 種間雑種の育成では幼胚培養での成功例 (Kuwada・Mabuchi, 1976; Stewart・Hsu, 1977; Arisumi, 1980; Shizukuda・Nakajima, 1982; Kato・Tokumasu, 1983; Kudo・Niimi, 1999) があり, ユキヤナギとシモツケとの交雑で幼胚を含む胚珠培養により雑種の獲得ができれば, 品種の多様化をもたらすと考えられた。

そこで本研究では, まずユキヤナギとシモツケとの種間雑種の種子が獲得できなかった要因を検討し, 胚珠培養による雑種の獲得を試みた。両種の開花期は異なることから, 花粉の貯蔵条件と発芽能力との関係を調べ, 次いで発芽能力のある花粉を受粉した場合の柱頭上および花柱内の花粉間の行動および子房内の胚珠形成状況を観察した。さらに, 交雑胚の幼胚培養を行い, 獲得できた個体の雑種検定を形態および RAPD 分析から検討した。

材料および方法

実験 1. 貯蔵花粉の人工培地上での粉発芽 (率) と柱頭上および花柱内での花粉管の行動

実験には *S. thunbergii* ‘蒲田早生’ と *S. japonica* (赤城山で自生している実生株) を供試した。両種はプラスチックポット (径 25 cm) に植えて, ガラス温室内で管理した。

1) 貯蔵花粉の発芽試験

S. thunbergii ‘蒲田早生’ の花粉は 1999 年 3 月 21 日に, *S. japonica* の花粉は 6 月 30 日に採取した。植物体上で開やくしたやくは 8 時間以内に採取し, 葉包紙に包み, 塩化カルシウムとともに管びんにいれて密栓し, 20℃, 5℃ および 30℃ で貯蔵した。花粉発芽率は, 20℃ で貯蔵した花粉は採集当日, 7 日, 30 日, 180 日後に, 5℃ と -30℃ で貯蔵した花粉は貯蔵開始から 7 日, 30 日, 180 日, 360 日後に人工培地 (10% ショ糖, 100 ppm ホウ酸, 0.8% 寒天) で, 25℃, 湿室条件で 4 時間培養して調査した。花粉管長が花粉粒の直径以上の花粉を発芽とみなし, 花粉の発芽は 1 区 100 粒ずつ観察し, 5 反復で発芽率を算出した。

2) 種間交雑法と花粉管伸長の観察

ユキヤナギとシモツケとの種間交雑は, -30℃ で 80 日間貯蔵した *S. thunbergii* ‘蒲田早生’ と -30℃ で 270 日間保存した *S. japonica* の花粉を用いて行った。除雄は温湯除雄法 (平田ら, 1994) に従って行った。すなわち, *S. thunbergii* ‘蒲田早生’ と *S. japonica* の花粉は開花前 6~9 日の株の枝部分を 46℃ の温湯に 10 分間浸漬して失活させた。受粉は柱頭の発達を確認し, 開花 1 日後に行った。

受粉後の花粉管伸長を観察するため, 受粉 12 時間後に子房を採取して FAA (ホルマリン: 酢酸: 70% エタノール = 5:5:90) で 12~16 時間固定した。その後, 流水で洗浄し, 70℃ の 4N 水酸化ナトリウム水溶液で 3 時間組織を軟化

したあと, 実体顕微鏡下で子房壁を除去して 0.01% アニリンブルー液 (2% リン酸三カリウム溶液に溶解) で 1~2 時間染色した。柱頭上および花柱内での花粉発芽および花粉管伸長は蛍光顕微鏡 (オリンパス BH2-RFC 型) を用い, 落射方式 (励起法, V 励起) で観察した。

実験 2. 種間交雑における肥大した胚珠数の変化

S. thunbergii ‘蒲田早生’ と *S. japonica* との正逆交雑および自家受粉 (対照区) は -30℃ で保存した花粉を用いた。除雄は実験 1 と同様に行った。子房内の肥大した胚珠は交雑後 5~25 日までの雌ずい (子房) を 5 日ごとに各 10 個ずつ採取し, 実体顕微鏡下で数えた。なお, 開花時の子房内の胚珠の大きさは両種とも縦約 0.3 mm, 横約 0.1 mm で, 自家受粉の場合, 交雑後 5 日ころより胚珠が急速に発達し, 交雑後 10 日で縦 0.5 mm, 横 0.3 mm 以上となった。この結果から縦 0.5 mm, 横 0.3 mm 以上に肥大した乳白色の胚珠は有胚胚珠とみなした。

実験 3. *S. thunbergii* ‘蒲田早生’ と *S. japonica* との交雑から得られた胚珠の培養

S. thunbergii ‘蒲田早生’ と *S. japonica* との交雑胚珠の培養を行った。対照として *S. thunbergii* ‘蒲田早生’ と *S. japonica* の自家受粉後の肥大胚珠が培養された。

交雑後 4, 16, 28 日の子房を採取し, 有効塩素濃度 1% の次亜塩素酸ナトリウム溶液 (Tween 20 を数滴添加) に 15 分間浸漬して表面殺菌した子房は滅菌水で 3 回洗浄した後, 実体顕微鏡下で解剖し, 無菌的に摘出した。胚を含むと考えられた肥大胚珠は 20 個ずつ直径 9 cm のプラスチックシャーレで培養された。

胚珠は, MS 培地 (Murashige・Skoog, 1962) の無機塩多量要素を 1/2 に希釈し, Fe-EDTA, 微量要素, ビタミンは等倍濃度とし, 3% ショ糖, 0.8% 寒天を含む培地で培養した。培地は pH 5.8 に調整後オートクレーブ (1.2 kg・cm⁻¹, 120℃, 15 分間) で滅菌し, クリーンベンチ内で滅菌済みの径 9 cm のプラスチックシャーレに約 25 ml ずつ分注した。

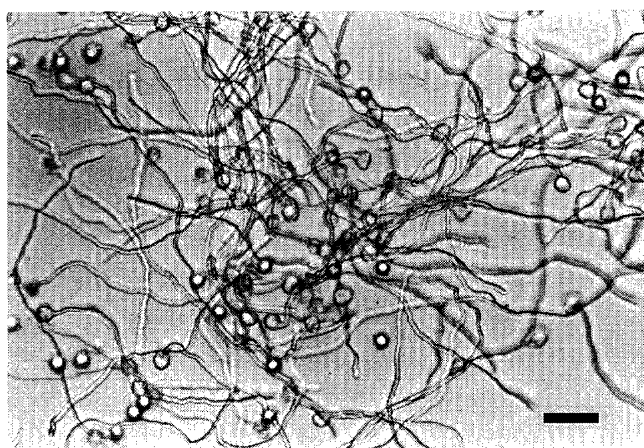
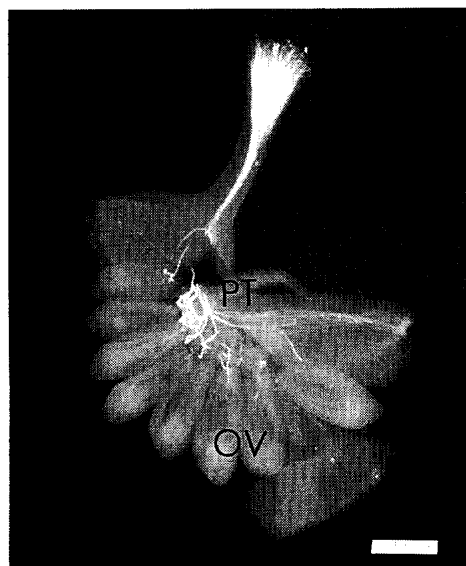
培養は 20℃, 暗黒下で行った。培養 20 日後に発芽した胚珠は, 16 時間日長, 3,000lx に移した。発芽 40 日後に, 葉と根が生長した個体と両親との間で, 葉形, 葉の先端部と基部の形態, 気孔の表面構造が比較調査された。なお, 気孔の形態は走査電子顕微鏡 (日本電子株式会社製, JSM-5800LV) で固定や乾燥を行わず, 生体をそのまま観察した。

RAPD 分析は雑種識別のために得られた個体と両親とで行った。それぞれの葉 1 g の全 DNA は CTAB 法 (Murray・Thompson, 1980) で抽出し, 10ng 鋳型 DNA, 0.5 μM プライマー, 0.1 M 各 dNTP, 1× reaction buffer (東洋紡, 大阪), 1unit DNA polymerase (東洋紡, 大阪) を添加し, 最終容量を 25 μl の反応液として PCR 反応を行った。

PCR 反応は 10 塩基のランダムプライマー (Kit A,

Table 1. *In vitro* germination rate of *Spiraea* pollen stored at temperatures of 20, 5 and –30 °C for different periods.

Species	Storage temperature (°C)	Germination rate of pollen stored for different periods (%)				
		0	7	30	180	360 (day)
<i>S. thunbergii</i>	20	83 ± 5 ^z	75 ± 2	52 ± 6	0	–
	5	– ^y	81 ± 4	69 ± 3	46 ± 3	0
	–30	–	83 ± 2	75 ± 3	74 ± 4	62 ± 3
<i>S. japonica</i>	20	92 ± 5	81 ± 2	53 ± 7	0	–
	5	–	87 ± 5	78 ± 4	49 ± 2	0
	–30	–	85 ± 2	81 ± 6	79 ± 3	73 ± 4

^z Mean ± SE.^y Not investigated.**Fig. 1.** *In vitro* germination of fresh pollen of *S. japonica* on a medium containing 10% sucrose, 100ppm boric acid and 0.8% agar. bar=20 μm.**Fig. 2.** Fluorescent micrographs showing pollen tubes in inter-specific pollination of *S. thunbergii* × *S. japonica*. Explants were fixed in FAA 72h after pollination. Bar=500 μm. PT=pollen tube, OV=ovule.

Operon Technologies, Alameda, CA) 2種類 (OPA-09, OPA-10) を用い, 94 °C で 3 分間保温した後, 変性 94 °C 1 分間, アニーリング 40 °C 1 分間, 伸長反応 72 °C 2 分間を 40 サイクル繰り返した後, 72 °C 7 分間で反応を終了し

た. PCR 産物は 1.5% アガロースゲルを用いて, TBE 緩衝液中で電気泳動を行った後, 2 μg・ml⁻¹ のエチジウムブロマイド溶液で染色し, 電気泳動パターンを紫外線照射下で観察した.

結 果

実験 1. 人工培地での花粉発芽と植物体上 (柱頭上および花柱内) での花粉管の伸長

1) 貯蔵花粉の人工培地での花粉発芽率

開やく時に採取した花粉の発芽率は, *S. thunbergii* ‘蒲田早生’ は 83%, *S. japonica* は 92% であった (第 1 表, 第 1 図). 20 °C で貯蔵した両種の花粉の発芽率は 30 日間ではほぼ半減し, 180 日間でゼロとなった. 5 °C で貯蔵した花粉は両種とも貯蔵後 360 日で発芽能力を失った. 一方, –30 °C で貯蔵した両種の花粉は, 360 日後でも *S. japonica* で 73%, *S. thunbergii* ‘蒲田早生’ で 62% 発芽した (第 1 表).

2) 柱頭上および花柱内での花粉管伸長

S. japonica の貯蔵花粉は *S. thunbergii* ‘蒲田早生’ の柱頭上で発芽し (第 2 図), 受粉 72 時間後には子房上部に達したあと, 胚珠まで伸長した. 一方, *S. thunbergii* ‘蒲田早生’ の貯蔵花粉は *S. japonica* の柱頭上で発芽して花柱内を伸長したが, 胚珠までには達しなかった.

実験 2. 種間交雑における肥大した胚珠数の変化

S. thunbergii ‘蒲田早生’ および *S. japonica* の自家受粉した子房内の胚珠数を受粉 5 日後から 5 日間ごとに調べたところ, いずれの時期の子房も, 子房当り平均 6 個の胚珠があった (第 2 表).

S. thunbergii ‘蒲田早生’ × *S. japonica* では, 交雑後 10 日の子房では平均 4 個の有胚胚珠数, 25 日のものでは 1~4 個の有胚胚珠があった. 一方, *S. japonica* × *S. thunbergii* ‘蒲田早生’ では, 交雑後 10 日では胚を含む胚珠はなかった (第 2 表).

実験 3. *S. thunbergii* ‘蒲田早生’ と *S. japonica* との交雑から得られた胚珠の培養

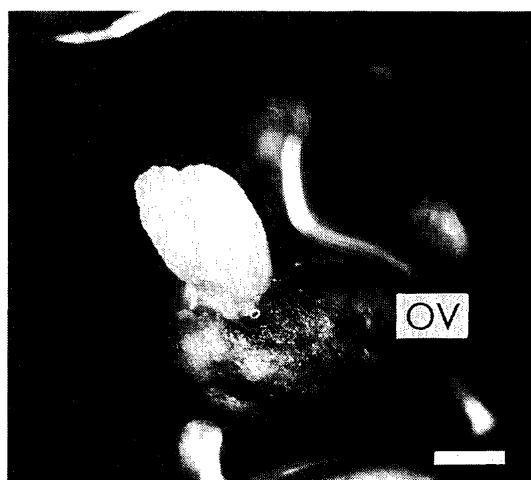
S. thunbergii ‘蒲田早生’ × *S. japonica* では, 受粉 4 日後に摘出した胚珠からは発芽個体が得られなかった. 一

Table 2. Number of ovules obtained from reciprocal crosses of *S. thunbergii* × *S. japonica* and from self-pollination.

Cross combination	No. of ovules pre ovary				
	5	10	15	20	25 (day)
<i>S. thunbergii</i> self	6 ± 1 ^z	6 ± 2	6 ± 1	6 ± 1	5 ± 1
<i>S. thunbergii</i> × <i>S. japonica</i>	6 ± 2	4 ± 1	4 ± 2	3 ± 1	2 ± 1
<i>S. japonica</i> self	6 ± 1	6 ± 1	6 ± 2	6 ± 1	6 ± 1
<i>S. japonica</i> × <i>S. thunbergii</i>	0	0	0	0	0

^z Mean ± SE.**Table 3.** Production of interspecific hybrids via ovule culture in *S. thunbergii* × *S. japonica*.

Days after pollination	No. of ovules cultured	No. of ovules with developed embryos (%) ^z	No. of seedlings developed from the embryos				No. of mature plants (%) ^y
			Albino (%) ^y	Seedlings with cotyledons (%) ^y	Seedlings with cotyledons	Seedlings with leaves and roots (%) ^y	
4	126	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
16	80	21(26)	7(9)	4(5)	2(3)	8(10)	8(10)
28	56	9(16)	3(5)	1(2)	1(2)	4(7)	4(7)

^z Total number of ovules which germinated 30 days after culture.^y Total number of plants obtained 60 days after culture.**Fig. 3.** A developing embryo protruding from an ovule of *S. thunbergii* × *S. japonica*. Ovules were cultured in 1/2MS medium (Murashige and Skoog, 1962) containing 3% sucrose and 0.8% agar. Bar=1 mm. OV=ovule.

方、16日後に摘出した26%の胚珠および28日後に摘出した16%の胚珠からは、発芽個体が得られた(第3表)。*S. thunbergii* ‘蒲田早生’ × *S. japonica*の交雑胚珠は摘出時期とは無関係に、培養開始後10~30日で発芽した(第3図)。しかし、葉と根をもった完全な実生は少なく、発育状況から実生は、およそ、①アルビノ、②子葉の展開のみ、③子葉の展開と発根(第4図)、④本葉展開と発根の4種類に区分できた。これらを胚珠培養と同一組成のホルモンフリー培地に継代したが、①、②および③の個体は

Table 4. Leaf characteristics of plantlets obtained from ovule culture between *S. thunbergii* × *S. japonica*.

Plantlets obtained from ovule culture and species	Whole shape of leaf	Shape of leaf apex	Shape of leaf base
No. 1	oval	obtuse	obtuse
No. 2	oval	obtuse	obtuse
No. 3	oval	obtuse	obtuse
No. 4	oval	obtuse	obtuse
No. 5	oval	obtuse	obtuse
No. 6	oval	obtuse	obtuse
No. 7	oval	obtuse	obtuse
No. 8	oval	obtuse	obtuse
<i>S. thunbergii</i>	oval	obtuse	obtuse
<i>S. japonica</i>	lanceolate	acute	obtuse

継代直後に生長を停止し枯死した。一方、④の本葉展開と発根のあった個体は、正常に生長し、最終的には12小植物体が得られた。交雑16日後に胚珠培養を行って得られた8個体について調査したところ、葉全体の形と先端部、基部の形態は*S. thunbergii*に似ていて、大きさは*S. japonica*に近かった(第4表、第5図)。雑種個体の気孔の表面構造は、大きさは*S. japonica*と類似し、周辺細胞の形態は*S. thunbergii*と類似していた。

OPA-09とOPA-10プライマーを用いたRAPD分析

では, *S. thunbergii* のバンド (OPA-9:1360bp) と *S. japonica* のバンド (OPA-9: 800 bp, OPA-10: 500 bp, 1080bp) が交雑個体に観察された (第7図).

考 察

S. thunbergii と *S. japonica* との開花期には相違があるため, 両種の交雑を行うには, 半年から1年の花粉の貯蔵

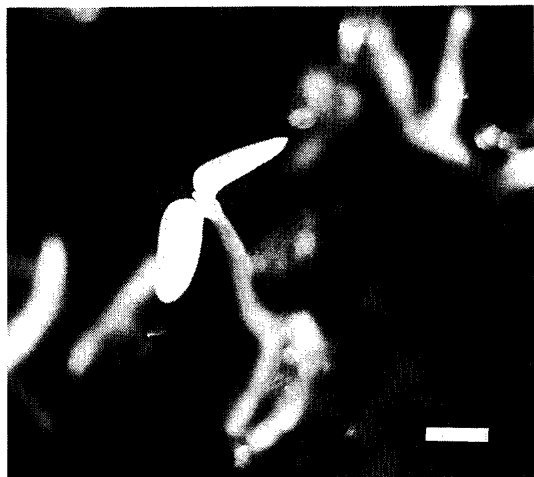


Fig. 4. Hybrid seedlings developing from embryos of *S. thunbergii* × *S. japonica* shown in Fig.3. Bar=5 mm.

が必要とされる. 一般に花粉は低温, 適度な湿条件で良い発芽力と受精力を保持することが知られている (Sahar・Spiegel-Roy, 1980; Koopowitz ら, 1984; Amma・Watanabe, 1985; Niimi・Shiokawa, 1992). そこで *Spiraea* 属2種の花粉の貯蔵温度が花粉発芽力に及ぼす影響を調査した. その結果, 花粉は 20℃で30日間, 5℃で180日間, -30℃で360日間発芽能力を保持することがわかった (第1表, 第1図). -30℃に貯蔵した両種の花粉は長期間保存しても人工培地上でよく発芽し, また柱頭上で発芽した. 花粉管は花柱内を伸長することがわかった.

S. thunbergii ‘蒲田早生’ × *S. japonica* の種間交雑では, 花粉管は受粉72時間後に胚珠に達し, 胚珠は肥大した. しかし, この交雑で種子が獲得できなかった. これは花粉の受精能力, 花粉管の伸長に問題があるのではなく, 受精した胚が退化することに問題があるものと推察された. 一方, その逆交雑 (*S. japonica* × *S. thunbergii* ‘蒲田早生’) では花粉は柱頭上で発芽したが, 胚珠へは到達せず, 胚珠も形成されなかった. よって, この交雑組合せで種子が獲得できなかったのは花粉管の花柱内での伸長停止が原因と推測された.

分類学的に, *S. thunbergii* は Chamaedryon 節に属し,

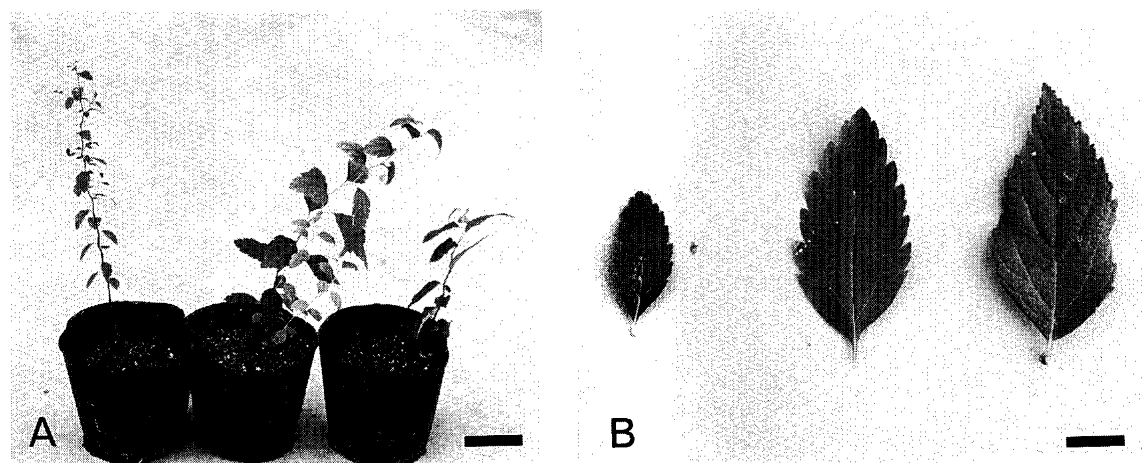
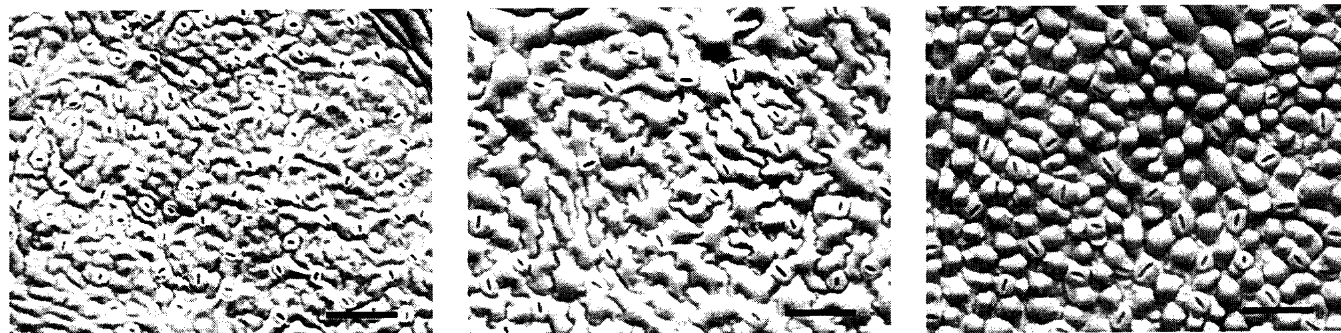


Fig. 5. Morphological characteristics of individual plants (A, bar=40 mm) and leaves (B, bar=10 mm). *S. thunbergii* (left), the interspecific hybrid (center) and *S. japonica* (right).



S. thunbergii

F₁ (No. 1)

S. japonica

Fig. 6. Photomicrographs of dorsal leaf surface. Showing *S. thunbergii* (left), hybrid No.1 (center) and *S. japonica* (right). Bar=40 μm.

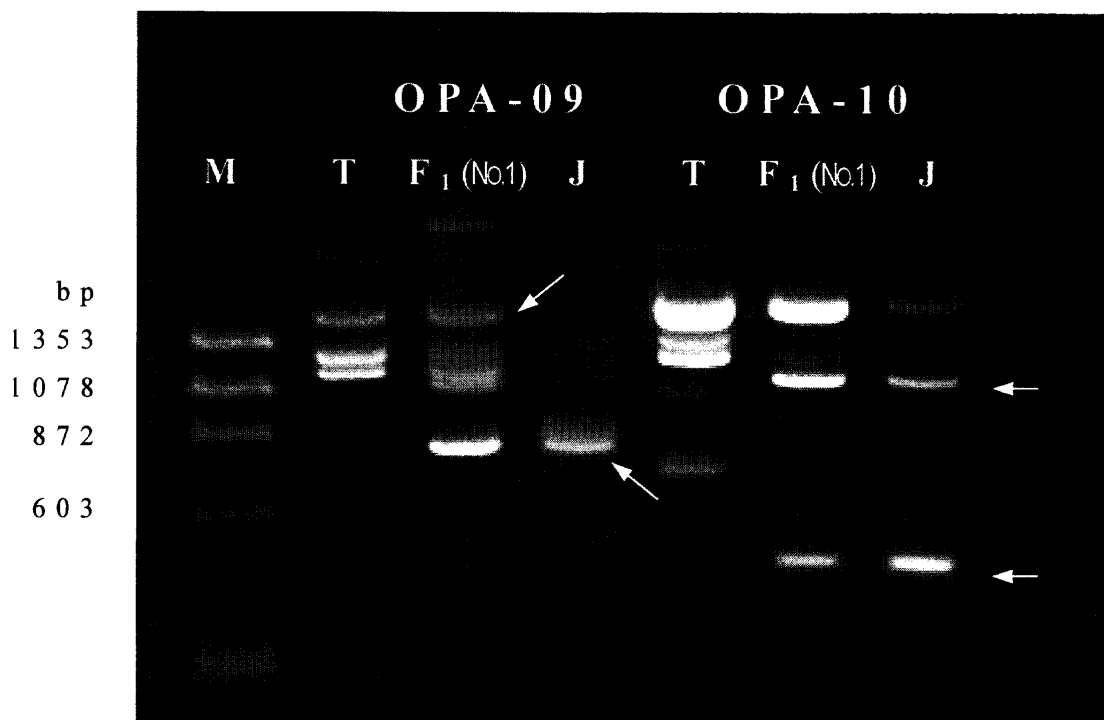


Fig. 7. Gel plate showing RAPD profiles of *S. thunbergii* (T), hybrid No.1 (F₁) and *S. japonica* (J). The profiles were generated by primer OPA-9 and OPA-10. Arrows indicate parent-specific polymorphic bands.

M: Size marker derived from ϕ X174/Hae III digest.

S. japonica は *Calospira* 節に属する (Rehder, 1986) ため、これらの種は遺伝的、地理的にも非常に遠縁の関係にあると考えられるが、*S. thunbergii* ‘蒲田早生’ × *S. japonica* では胚珠が形成され、胚珠培養を行えば正常な個体が得られ、その逆交雑では胚珠が形成されなかった。この現象は、ユリ (Niimi ら, 1996) やトマト (Hogenboom, 1984) などでも報告されている一側性不和合性が *Spiraea* 属にも存在する可能性を示している。しかし、本報告は1品種・系統間での交雑結果であるので、今後は交配組合せ数を多くして、両者の遺伝的関係をさらに検討する必要がある。

S. thunbergii ‘蒲田早生’ × *S. japonica* の胚珠培養で正常に生育する個体が得られた。得られた個体の形態は、葉形、葉の先端部と基部の形態、気孔の周辺細胞の形態は *S. thunbergii* と類似し、葉と気孔の大きさは花粉親である *S. japonica* と類似していた (第4表, 第5図, 第6図)。また、RAPD 分析で、交雑個体から *S. thunbergii* と *S. japonica* に特有のバンドが観察された (第7図)。従って胚珠培養によって得られた個体は両種の種間雑種であると判断した。しかし、胚珠培養の過程で枯死する個体や異常な個体が多く観察され、正常に発育した個体は10%程度と少なかった。雑種個体の多様化を図る上でも多数の交雑個体を獲得することは重要であり、今後は胚珠摘出時期、培養条件などを詳細に検討する必要がある。

摘 要

ユキヤナギ (*Spiraea thunbergii*) とシモツケ (*S. japonica*) を交配して赤花のユキヤナギの作出を目的とし

て、両種間で正逆交雑を行った。

1. 乾燥条件、 -30°C で貯蔵した花粉は貯蔵後360日でも発芽および受精能力を維持することがわかった。

2. *S. thunbergii* × *S. japonica* では、 -30°C で270日間貯蔵した花粉は柱頭上で良く発芽し、花粉管は花柱内を伸長して子房内の胚珠に達し、10日後には胚珠の肥大が観察された。一方、*S. japonica* × *S. thunbergii* では、花粉は柱頭上で良く発芽したが、子房内の胚珠へ到達しなかった。

3. *S. thunbergii* × *S. japonica* の交配16日後に摘出して培養した胚珠は正常に発育する実生を生じ、8個体を得られた。それらの個体の形態は両親の中間を示し、RAPD パターンは両親のバンドを併せ持ったことから雑種植物であると判断した。

引用文献

- Amma, S. and A. Watanabe. 1985. Long-term storage of germ plasm of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). JARQ. 19: 196-201
- Arisumi, T. 1980. *In vitro* culture of embryos and ovules certain incompatible selfs and crosses among *Impatiens* species. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 105: 629-631.
- Asano, Y. 1980. Studies on Crosses between distantly related species of Lilies VI. Pollen-tube growth in interspecific crosses on *Lilium longiflorum* (I). J. Japan. Soc. Hort. Sci. 49: 392-396.
- Asano, Y. 1981. Pollen-tube growth in interspecific crosses of *Lilium longiflorum* Thunb. (II). J. Japan. Soc. Hort.

- Sci. 50: 350-354.
- 五井正憲. 1985. ユキヤナギ. p.232-234. 朝日園芸百科. 16. 朝日新聞社. 東京.
- 五井正憲. 1988. シモツケ属. p.542-544. 園芸植物大辞典 2. 小学館. 東京.
- 花岡喜重. 1986. ユキヤナギの鉢物化技術. 農業および園芸. 61:326-330.
- 平田良樹・山口博康・久松 完・浦嶋泰文. 1994. シモツケ類の温湯浸漬の時期と除雄効果. 平成5年度野菜・茶業試験場花き部研究年報. 114-115.
- Hogenboom, N. G. 1984. Incongruity: non-functioning of intercellular and intracellular partner relationship through non-matching information. p.640-654. In : H. F. Linskens and J. Heslop-Harrison (eds). Cellular interactions. (Encyclopedia of plant physiology, new species, vol.17). Springer, Heidelberg.
- Hwang, Y. J., H. Okubo, and K. Fujieda. 1992. Pollen tube growth, fertilization and embryo development of *Camellia japonica* L. × *C. chrysanth* (Hu) Tuyama. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 60: 955-961.
- 飯塚正英・工藤暢宏 1998. 胚・胚珠培養によるピンクユキヤナギの育成. 平成9年度群馬県園芸試験場育種開発試験成績書. 7-8.
- Ishizaka, H. and J. Uematsu. 1992. Production of interspecific hybrids of *Cyclamen persicum* Mill. and *C. hederifolium* Aiton. by ovule culture. Japan. J. Breed. 42: 353-366.
- Kato, M. and S. Tokumasu. 1983. Characteristics of F_1 hybrids produced by ovule-culture in ornamental pelargonium. Acta Horticulturae 131: 247-252.
- Koopowitz, H., R. Voss and C.O' Neil. 1984. Long-term storage of gladiolus pollen. HortScience 19: 513-514.
- Kudo, N. and Y. Niimi. 1999. Production of interspecific hybrids between *Hydrangea macrophylla* f. *hortensia* (Lam.) Rehd. and *H. arborescens* L. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 68: 428-439.
- Kuwada, H. and T. Mabuchi. 1976. Ovule and embryo culture of the seeds obtained from the crosses between *Hibiscus asper*, *H. cannabinus* and *H. sabdariffa*. Japan. J. Breed. 26: 298-306.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Murray, J. M. and W. F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res. 8: 4321-4325.
- Niimi, Y., M. Nakano and K. Maki. 1996. Production of interspecific hybrids between *Lilium regale* and *L. rubellum* via ovule culture. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 64: 919-925.
- Niimi, Y. and Y. Shiokawa. 1992. A study on the storage of *Lilium* pollen. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 61: 399-403.
- 大橋広好・舩山泰一・大場秀章. 1989. シモツケ属. p181-185. 日本の野生植物木本 I. 平凡社. 東京.
- Rehder, A. 1986. SPIRAEA. p.327-342. Manual of Cultivated Trees and Shrubs. Dioscorides Press, Portland. Oregon
- Sahar, N. and P. Spiegel-Roy. 1980. Citrus pollen storage. HortScience 15: 81-82.
- Shizukuda, N. and T. Nakajima. 1982. Production of interspecific hybrids between *Nicotiana rustica* L. and *N. tabacum* L. through ovule culture. Japan. J. Breed. 32: 371-377.
- Stewart, J. M. and C. L. Hsu. 1977. In-ovule embryo culture and seedling development of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Planta 137: 113-117.